

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Monika Ježková

Fasciolidní motolice: od genů k diagnostice

Fasciolid flukes: from genes to diagnostic tools

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Roman Leontovyč

Školitel – konzultant: RNDr. Martin Kašný Ph.D.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13. 8. 2018

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem lidem, kteří mě během magisterského studia podporovali. Největší dík patří vedoucímu mé práce Mgr. Romanu Leontovyčovi za cenné rady, připomínky, trpělivost a velkou podporu. Dalé bych chtěla poděkovat RNDr. Martinovi Kašnému, Ph.D., za připomínky a pomoc během mé práce. Děkuji Ing. RNDr. Martinovi Markovi Ph.D. za poskytnutí laboratorního materiálu a rad v mé práci. Děkuji také všem lidem v laboratoři za vytvoření příjemného pracovního prostředí a za pomoc při mé práci, zvláště Tomášovi, Líba, Hance, Vládovi a Martinovi, dále také holkám z patologie, že to se mnou během mého studia vydržely a vždy mi vyšly vstříc. Zvláštní poděkování patří celé mé rodině a přátelům, kteří mi během studia byli vždy velkou oporou, a bez kterých by jsem to nezládla.

Abstrakt

Motolice z čeledi Fasciolidae jsou parazité savců včetně člověka. Veterinárně a medicínsky významné druhy, vyskytující se i na území České Republiky, jsou *Fasciola hepatica* a *Fascioloides magna*. *Fascioloides magna* a *F. hepatica* infikují široké spektrum divokých i domácích přežvýkavců, v případě *F. hepatica* může být infikován i člověk. Obě motolice jsou zodpovědné za závažná poškození jaterního parenchymu či žlučovodů u jejich definitivního hostitele, což je příčinou ztráty hmotnosti, anémie, snížené produkce mléka a v některých případech i smrti hostitele. Klíčovou roli při kontrole infekce *F. hepatica* a *F. magna* hraje účinná a včasná diagnostika. Nejrozsáhlejší diagnostické metody jsou založené převážně na sérodiagnostických metodách využívajících specifické antigeny např. exkrečně-sekreční produkty (ESP). Diagnostické markery založené na ESP mohou být díky jejich heterogenitě nespecifické, a také reprodukovatelnost takové metody je značně omezená. Při diagnostice fasciolidních motolic se používají také konkrétní proteiny obsažené v ESP. Tento přístup však vyžaduje biologický materiál a laboratorní postupy, spojené s identifikací, purifikací a testováním antigenicity vybraných proteinů. Aktuální rozvoj paralelních sekvenačních technologií generuje obrovské množství genomových, transkriptomových a proteomových dat, která jsou volně dostupná. Tato data mohou být využita pro *in silico* predikci antigenních epitopů proteinů, které mohou sloužit k výrobě přesně definovaných syntetických mutiantigenních molekul. Predikce takovýchto diagnostických markerů by se obešla bez potřeby biologického materiálu a časově a finančně náročné laboratorní práce. V předkládané práci byly, s využitím transkriptomových a proteomových dat *F. magna*, predikovány proteinové molekuly sekretované z těla této motolice a dále byly definovány jejich antigenní epitopy. Tyto epitopy byly využity k tvorbě multiantigenních syntetických fúzních proteinů. Celkem byly sestaveny tři fúzní proteiny, z nichž každý byl složen ze tří antigenních epitopů. Antigenita těchto proteinů byla poté testována metodou ELISA s využitím sér zvířat infikovaných *F. magna* a *F. hepatica*. Výsledky ukazují, že se nepodařilo navrhnout syntetický protein, který by dostatečně intenzivně reagoval se séry nakažených zvířat. Shrnutý tedy byly možné příčiny a dále byla navržena optimalizace predikce sekrečních molekul, jejich antigenních epitopů a konstrukce rekombinantních fúzních proteinů.

Klíčová slova: *Fascioloides magna*, diagnostika, *in silico* predikce, fúzní protein, antigenní epitopy

Abstract

Liver flukes of the family Fasciolidae are parasites of mammals including human. *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* are considered as a veterinary and medically important species occurring also in the Czech Republic. *Fascioloides magna* and *F. hepatica* infect wide spectrum of wild and domestic ruminants and in case of *F. hepatica* human can be also infected. Both flukes are responsible for damage of liver tissue and/or bile-ducts of their definitive hosts causing weight lose, anemia, reduced productivity and in specific cases the death of the host. Effective diagnosis plays the key role in control of *F. hepatica* and *F. magna* infections. Current diagnostics is predominantly based on serodiagnostic methods using specific antigens e.g. from excretory-secretory products (ESPs). Due to heterogeneity of ESPs, such diagnostic markers can lack the specificity and also the reproducibility of the method is poor. Particular proteins of ESPs are often used in diagnostics of fasciolid flukes. Such approach requires biological material and laboratory procedures associated with identification, purification and antigenicity testing of selected proteins. Recent development of parallel sequencing technologies results in huge amount of genomic, transcriptomic and proteomic data, which are publicly available. Such data allows to use the bioinformatics tools for *in silico* predictions of antigenic epitopes, which can be used for construction of precisely defined synthetic multiantigenic molecules. Prediction of such molecules could be done without any biological material and time-consuming laboratory work. In presented work the secreted molecules and their antigenic epitopes of *F. magna* have been predicted using of bioinformatics approach and transcriptomic/proteomic data. Predicted antigenic epitopes were used for construction of syntetic multiantigenic fusion proteins. In total three fusion proteins were prepared an each of them contatined three antigenic epitopes. Antigenicity of these proteins was tested by ELISA method using of sera of infected animals by *F. magna* and *F. hepatica*. The results showed that constructed synthetic proteins did not react specifically to tested sera, so the possible causes have been discussed and optimisation of prediction of the secretory molecules, their antigenic epitopes and construction recombinant fusion proteins have been suggested.

Key words: *Fascioloides magna*, diagnostics, *in silico* prediction, fusion proteins, antigenic epitopes

Obsah

1	ÚVOD	1
2	CÍLE PRÁCE.....	2
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1	MOTOLICE ČELEDI FASCIOLIDAE	3
3.1.1	Životní cyklus fasciolidních motolic	4
3.1.2	Významní zástupci motolic z čeledi Fasciolidae.....	5
3.1.3	Patogenita a průběh infekce <i>F. hepatica</i> a <i>F. magna</i>	6
3.2	DIAGNOSTIKA MOTOLIC ČELEDI FASCIOLIDAE	6
3.2.1	Exkrečně-sekreční produkty (ESP)	9
3.2.2	Možnosti využití ESP při diagnostice fasciolidních motolic	10
3.2.3	Vlastnosti sekretovaných molekul.....	12
3.2.4	Syntetické antigenní epitopy	14
3.2.5	Fúzní proteiny.....	16
3.3	BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA	17
3.3.1	Sekvenování nové generace	18
3.3.2	Predikce sekretovaných molekul	21
3.3.3	Predikce antigenních epitopů	25
4	METODIKA	27
4.1	BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA.....	29
4.1.1	<i>In silico</i> predikce sekretovaných molekul z transkriptomu <i>F. magna</i>	29
4.1.2	Anotace sekretomu	30
4.1.3	Srovnání <i>in silico</i> sekretomu s reálným proteomem exkrečně-sekrečních produktů.....	30
4.1.4	Stanovení míry exprese transkriptů v transkriptomu.....	31
4.1.5	Identifikace antigenní sekvence u sekretovaných molekul	31
4.2	LABORATORNÍ ANALÝZA.....	32
4.2.1	Konstrukce a amplifikace templátové DNA fúzních proteinů	32
4.2.2	Ligace insertu do klonovacího vektoru	37
4.2.3	Klonování – transformace bakterií a ověření přítomnosti insertu v klonovacím vektoru.....	38
4.2.4	Ligace insertu do expresního vektoru a exprese v <i>E. coli</i>	40
4.2.5	In-fusion cloning	41
4.2.6	Exprese <i>E. coli</i> BL21	42
4.2.7	Ověření přítomnosti exprimovaného proteinu a jeho purifikace.....	43
4.2.8	ELISA	44
5	VÝSLEDKY	46
5.1.1	<i>In silico</i> predikce sekretovaných molekul z transkriptomu dospělců <i>F. magna</i>	46
5.1.2	Anotace sekretomu	46
5.1.3	Srovnání <i>in silico</i> sekretomu s proteomem exkrečně-sekrečních produktů .	47
5.1.4	Stanovení míry exprese transkriptů	49
5.1.5	Identifikace antigenních epitopů u sekretovaných molekul	50

5.2	LABORATORNÍ ANALÝZA	51
5.2.1	Konstrukce fúzních proteinů a ligace do klonovacího vektoru	51
5.2.2	In-fusion cloning	52
5.2.3	Ověření přítomnosti exprimovaného proteinu a jeho purifikace.....	52
5.2.4	ELISA.....	53
6	DISKUZE	54
6.1	BIOINFORMATICKÁ ANALÝZA.....	54
6.1.1	Predikce <i>in silico</i> sekretomu.....	54
6.1.2	Anotace <i>in silico</i> sekretomu	55
6.1.3	Srovnání <i>in silico</i> sekretomu s proteomem exkrečně-sekrečních produktů .	56
6.1.4	Predikce antigenních epitopů a navržení fúzních proteinů.....	57
6.2	LABORATORNÍ ANALÝZA.....	59
6.2.1	Exprese a purifikace rekombinantního fúzního proteinu	59
6.2.2	Testování antigenicity rekombinantních fúzních proteinů	60
7	ZÁVĚR.....	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	63
	SEZNAM PŘÍLOH NA CD.....	75
	SEZNAM ZKRATEK	76

1 Úvod

Motolice z čeledi Fasciolidae jsou endoparazité obratlovců, jejichž životní cyklus je dvouhostitelský zahrnující mezipřehostitelského plže a definitivního hostitele (přehostitel, člověk) (Pybus, 2001). Čeleď Fasciolidae zahrnuje celkem devět zástupců, z nichž mezi veterinárně a medicínsky významné druhy, se kterými se můžeme setkat i v rámci České Republiky, patří *Fasciola hepatica* a *Fascioloides magna* (Lotfy et al., 2008). Kosmopolitní *F. hepatica*, která může parazitovat u přehostitelů i u člověka, způsobuje onemocnění – fasciolózu. Ze Severní Ameriky byla do Evropy introdukována *F. magna*, způsobující onemocnění – fascioloidózu u přehostitelů, u člověka nákaza touto motolicí však prokázána nebyla. Definitivní hostitel se nakazí, v případě obou druhů motolic, požitím rostlin s infekčním stádiem parazita. Motolice u něj způsobují závažné poškození jater a žlučových cest, v těžkých případech onemocnění končí smrtelně (Pybus, 2001). Vzhledem k závažnosti této parazitární choroby, ale také kvůli časté rezistenci na podávaná léčiva je kladen stále větší důraz na vylepšování diagnostických metod, které by onemocnění odhalily již v časně fázi infekce (Kelley et al., 2016; WHO, 2018). Diagnostika fasciolidních motolic je často zaměřena na využití jejich exkrečně-sekrecních produktů (ESP) nebo jednotlivých proteinů v ESP obsažených (Osman et al., 1995; Gonzales Santana et al., 2013). Tento postup je však časově náročný, vyžaduje sběr živých parazitů, což může být často obtížné. Navíc materiál, který získáme není přesně definovaný což komplikuje reprodukovatelnost metody. Vzhledem k dostupnosti genomových a transkriptomových dat jsou bioinformatické metody slibnou alternativou při predikci ESP, ale také jejich antigenních epitopů, jejichž spojením by mohla vzniknout přesně definovaná syntetická multiantigenní molekula (rekombinantní fúzní protein). Navržený fúzní protein, s vysokou specifitou, by pak mohl zastoupit antigeny využívané v sérodiagnostice těchto motolic. Hlavním cílem této práce bylo pomocí bioinformatických nástrojů navrhnout postup, který by umožňoval predikci ESP a jejich antigenních epitopů. Dále, kombinací těchto epitopů, navrhnout a sestavit syntetickou antigenní molekulu a testovat její antigenicitu, a tedy využitelnost při diagnostice *F. magna* a *F. hepatica*.

Všechny přílohy, které jsou součástí diplomové práce jsou vzhledem k velkému objemu dat nahrány na přiloženém CD.

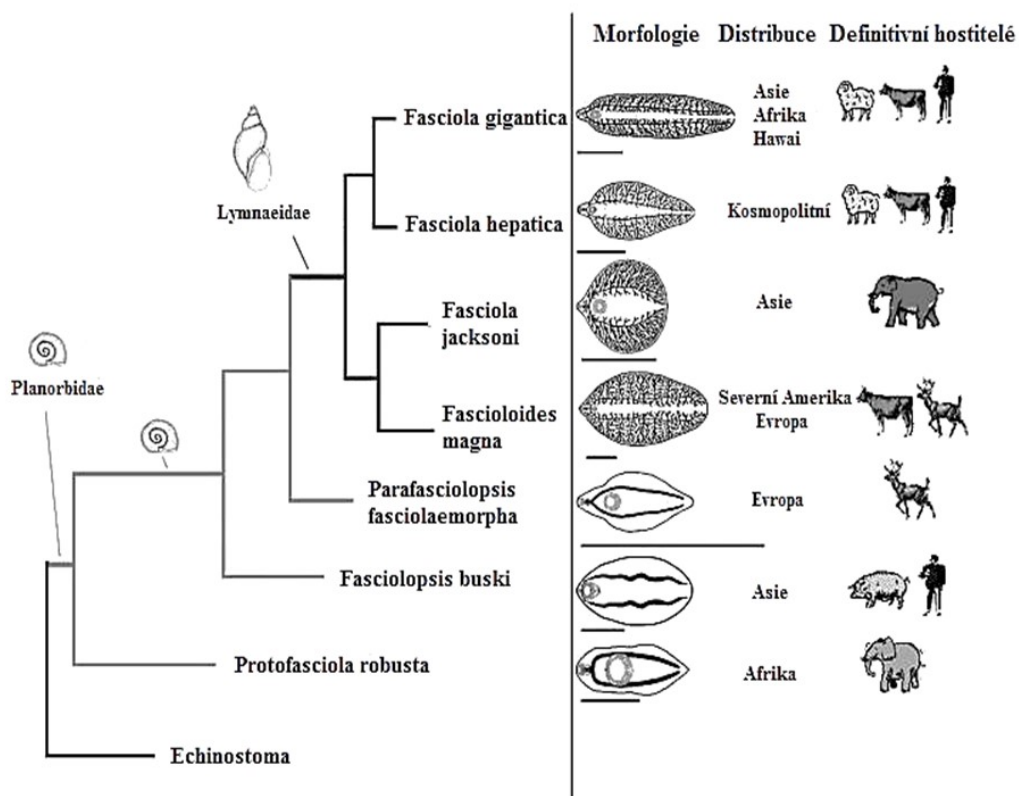
2 Cíle práce

1. Shrnutí dosavadních poznatků souvisejících s vývojem diagnostických metod u fasciolidních motolic.
2. S využitím bioinformatických nástrojů navrhnout postup, který umožní predikci antigenních proteinů na základě transkriptomových dat.
3. Na základě znalosti struktury proteinových molekul navrhnout a připravit syntetickou multiantigenní molekulu složenou z několika odpovídajících syntetických antigenních epitopů a testovat její využití v diagnostice fasciolidních motolic.

3 Literární přehled

3.1 Motolice čeledi Fasciolidae

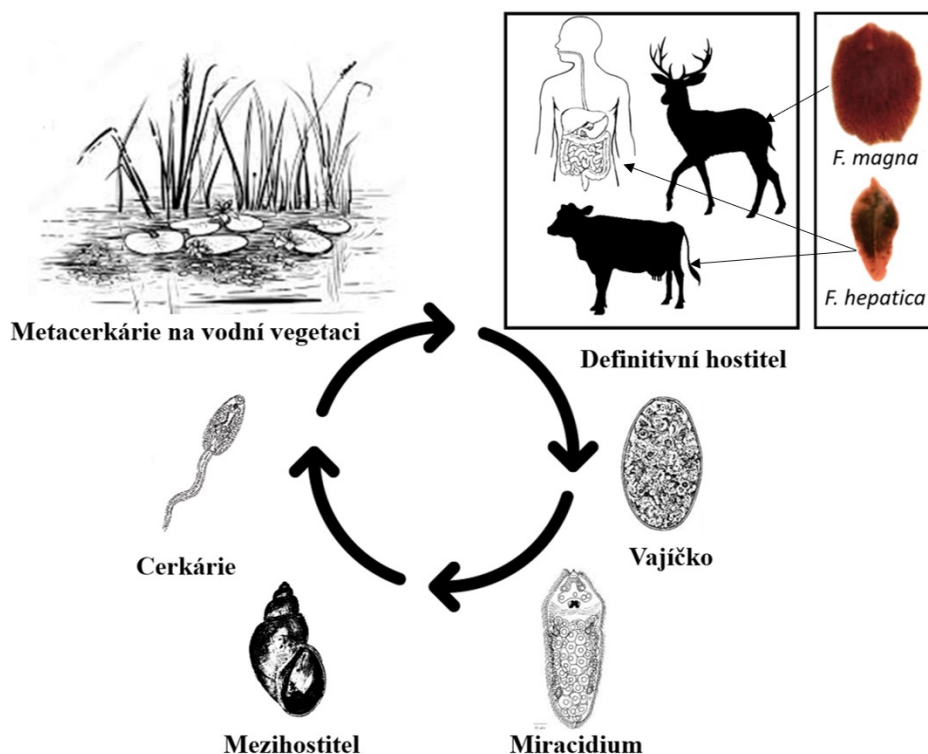
Čeleď Fasciolidae (Trematoda, Digenea) zahrnuje velké distomní motolice parazitující v trávicím traktu domácích i volně žijících přežvýkavců. Některé druhy mohou infikovat člověka. V současnosti je do této čeledi zařazeno 9 druhů (*Fasciola hepatica*, *F. gigantica*, *F. jacksoni*, *F. nyanzae*, *Fasciolopsis buski*, *Fascioloides magna*, *Protofasciola robusta*, *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*, *Tenuifasciola tragelaphi*) (Lotfy *et al.*, 2008), viz obr. 1. Za veterinárně a medicínsky důležité druhy v rámci České Republiky lze považovat *F. hepatica* a *F. magna*, jimiž se tato práce bude zabývat.



Obrázek 1 - Fylogenetický strom fasciolidních motolic: morfologie, distribuce, mezihostitelé a definitivní hostitelé (Lotfy *et al.*, 2008)

3.1.1 Životní cyklus fasciolidních motolic

Životní cyklus fasciolidních motolic zahrnuje meziphostitele (vodního plže) a definitivního hostitele. Jedná se tedy o cyklus dvouhostitelský, obr. 2. Vajíčka motolic jsou vylučována trusem definitivního hostitele do vnějšího prostředí, kde dochází k embryonizaci. Uvnitř vajíčka se vyvíjí první larvální stadium – miracidium, které vajíčko následně opouští otevřením operkula (víčka). Ve vodním prostředí miracidium vyhledává vhodného meziphostitele – vodního plže, do něhož aktivně proniká. Ve vodním plži se vyvíjí nejprve stadium mateřské sporocysty, následně redie. V konečné fázi vývoje motolice v meziphostiteli dochází k namnožení cercarií uvnitř redie. Cercárie opouští jeho tělo a dostávají se opět do vnějšího prostředí, kde encystují na vodní vegetaci a vytvoří tak stadium infekční pro definitivního hostitele – metacerkárie. K nákaze dochází alimentárně požitím infekční cysty. Po požití dochází v GIT (gastro-intestinální trakt) definitivního hostitele k excystaci metacerkárie. Juvenilní motolice migrují na místo jejich definitivní lokalizace, v případě *F. hepatica* a *F. magna* do oblasti žlučových a jaterního parenchymu kde poškozují tkáň a produkují zde vajíčka (Pybus, 2001).



Obrázek 2 – Životní cyklus *Fasciola hepatica* a *Fascioloides magna* (Cuomo et al., 2009; Francisco et al., 2012; Leontovyč et al., 2014; 2018; Shutterstock, 2003)

3.1.2 Významní zástupci motolic z čeledi Fasciolidae

Veterinárně a medicínsky významné druhy fasciolidních motolic shrnuje tab. 1. Další motolice patřící do této čeledi jsou *Fasciola jacksoni* vyskytující se v Asii a *Protofasciola robusta* vyskytující se v Africe, jejichž definitivním hostitelem je slon. U jelenovitých v Evropě se vyskytuje *Parafasciolopsis fasciolaemporhpa*. Dále do této čeledi patří *F. nyanzae* parazitující u hrocha a *Tenuifasciola tragelaphi* parazitující u antilop (Lotfy *et al.*, 2008).

Tabulka 1 – Základní charakteristika veterinárně a medicínsky významných motolic čeledi Fasciolidae: *Fasciola hepatica*, *F. gigantica*, *Fascioloides magna* a *Fasciolopsis buski* (velikost, výskyt, meziphostitelé, definitivní hostitelé, lokalizace a příznaky) (Kaufmann, 1996; Jíra, 1998; Pybus, 2001)

	<i>Fasciola hepatica</i>	<i>Fasciola gigantica</i>	<i>Fascioloides magna</i>	<i>Fasciolopsis buski</i>
Velikost	20-30 x 8-13 mm	75 x 3-12 mm	4-100 x 20-35 mm	20-75 x 8-20 mm
Výskyt	kosmopolitní	tropické oblasti Afriky a Asie	Severní Amerika, Evropa	východní a jihovýchodní Asie
Meziphostitel	plž z čeledi Lymnaeidae (<i>Galba truncatula</i> , <i>Pseudosuccinea columella</i> , <i>L. humilis</i>) nebo rod <i>Fossaria</i> , či <i>Stagnicola</i>	plž z čeledi Lymnaeidae (<i>Radix auricularia</i> , <i>R. natalensis</i>)	plž z čeledi Lymnaeidae (<i>Galba truncatula</i> , <i>Radix labiata</i>) nebo rod <i>Fossaria</i> , či <i>Stagnicola</i>	plži z čeledi Planorbidae (rody Segmentina, Hippeutis)
Definitivní hostitel	přežvýkavci (skot, ovce, jelenovití), člověk	domácí přežvýkavci (skot, ovce, kozy), volně žijící (žirafa, pakůň), člověk	volně žijící a domácí přežvýkavci (jelenovití, skot, ovce)	člověk, prase, pes
Lokalizace	žlučové cesty	žlučové cesty	jaterní parenchym	stěna střeva
Příznaky onemocnění	zvracení, průjem, ikterus, cholelithiáza, eozinofilie, leukocytóza, jaterní cirhóza	akutní hepatitida, anémie, poškození žlučových cest	úbytek hmotnosti, eozinofilie, poškození jater	průjem střídavě se zácpou, bolest v břiše, zvracení, edémy, intoxikace a oběhové selhání

3.1.3 Patogenita a průběh infekce *F. hepatica* a *F. magna*

Fasciola hepatica způsobuje onemocnění – fasciolózu. Parazit se nachází ve žlučovodech definitivního hostitele a způsobuje zde kalcifikace a fibrózu tkáně (Pybus, 2001)

Fascioloides magna způsobuje onemocnění – fascioloidózu. Dospělé motolice se nacházejí v játrech, kde indukují tvorbu pseudocysty, uvnitř které se parazit nachází nejčastěji v párech. Pseudocysta komunikuje se žlučovody a dochází tak k uvolňování vajíček do trávicího systému (Erhardová - Kotrlá, 1971; Pybus, 2001).

Infekce těmito motolicemi probíhá nejprve akutně. Juvenilní jedinci migrují přes stěnu tenkého střeva do jater, v jaterním parenchymu se živí krví a migrací způsobují jeho značné poškození. V chronické fázi se motolice dostávají na místo své definitivní lokalizace (viz tab. 1), kde dospívají, rozmnožují se a produkují vejčka. Chronická fáze je spojena také s mechanickým poškozením tkáně – fibróza jater (*F. magna*), nebo kalcifikací žlučovodů (*F. hepatica*) (Pybus, 2001). Během infekce dochází k vylučování exkrečně-sekrečních produktů (ESP) motolic, které hrají důležitou roli při migraci, trávení krve a umožňují parazitovi přežít v organismu hostitele (Gonzales Santana *et al.*, 2013). Přes intenzivní studium nových diagnostických metod, které by zvýšily specifitu a citlivost zůstává diagnostika těchto parazitů v akutní fázi infekce stále obtížná (Mazeri *et al.*, 2016). Hlavním důvodem je, že mnoho diagnostických testů slouží pouze k průkazu přítomnosti, či nepřítomnosti daného parazita, a to často až v chronické fázi infekce (Charlier *et al.*, 2014).

3.2 Diagnostika motolic čeledi Fasciolidae

Obecně jsou diagnostické metody děleny na přímé (přímý nález parazita) a nepřímé (průkaz parametrů odhalující parazitární infekci). Mezi přímé metody patří pitva, koprologie a metody molekulární biologie. Nepřímou metodou je stanovení průkazu protilátek proti parazitovi (reakce na přítomnost exkrečně-sekrečních produktů parazita), stanovení jaterních enzymů nebo hematologické vyšetření (Kaufmann, 1996; Jíra, 1998; Pybus, 2001).

Přímé diagnostické metody:

Pitva definitivního hostitele je základní metodou, při které lze prokázat dospělé jedince v napadané tkáni (játra, žlučovody). U *F. magna* můžeme najít na povrchu, či uvnitř jater a dále na plicích, popř. v tělní dutině tzv. tmavý pigment – hematin (vedlejší produkt při trávení krve). Pitva patří mezi nejspolehlivější metody průkazu parazita, při které lze nalézt dospělé, pseudocysty i juvenilní stádia motolic. Jedná se však o metodu invazivní (Pybus, 2001).

Koprologie je metodou kde zjišťujeme přítomnost vajíček v trusu definitivního hostitele. Koprologické vyšetření je jednoduché, spolehlivé, ale vajíčka lze prokázat ve stolici až v chronické fázi (po 10. týdnu infekce). Dalším problémem je, že vajíčka fasciolidních motolic (*F. hepatica*, *F. gigantica*, *F. magna*) nelze spolehlivě morfologicky rozlišit (Kaufmann, 1996; Jíra, 1998; Pybus, 2001).

Molekulárně biologické metody jsou založeny na průkazu specifické DNA v určitém materiálu (krev, stolice, tkáň), lze tak identifikovat specifický úsek DNA, a tedy konkrétní druh parazita. K identifikaci se využívají molekulárně diagnostické markery (specifické nukleotidové sekvence v genomu daného parazita). Při diagnostice fasciolidních motolic je často využíván např. ITS2 region (internal-transcribed-spacer), specifický úsek ribozomální DNA vykazující vyšší stupeň mezidruhovité variability (Králová-Hromadová et al., 2016). Hlavní metodou pro identifikaci je polymerázová řetězová reakce (PCR) založena na amplifikaci úseku DNA. Hlavní výhodou PCR je identifikace parazitární DNA v akutní fázi infekce, vysoká citlivost a specifita. Mezi nevýhody patří např. snadná kontaminace vzorku nebo degradace materiálu (Tavares *et al.*, 2011).

Nepřímé diagnostické metody:

Imunologické metody mezi něž patří ELISA (Enzyme-linked-immunosorbent-assay) a immunoblot patří mezi běžné metody nepřímé diagnostiky založené na reakci antigenu s protilátkou. Jako antigen pro tyto metody lze využít například exkrečně sekreční produkty (ESP) viz níže, které jsou parazitem vylučovány do vnitřního prostředí hostitele a mohou vyvolávat tvorbu protilátek (Mas-Coma et al., 2005; Charlier *et al.*, 2014).

- ELISA – metoda sloužící ke stanovení koncentrace antigenů či protilátek, nejčastěji v séru definitivního hostitele; principem je interakce antigenu a

protilátky (na jednoho z dvojice je navázán enzym katalyzující přeměnu substrátu na barevný produkt) (Toman et al., 2009); metoda byla využita např. při detekci protilátek v krvi u *F. hepatica* (Salimi-Bejestani et al., 2005), ale také v trusu (Mezo et al., 2004) nebo mléku (Salimi-Bejestani et al., 2007)

- Immunoblot – metoda sloužící k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny; princip je založen na separaci proteinů pomocí elektroforézy a následný přenos např. na nitrocelulózovou membránu, kde je daný protein detekován pomocí primární protilátky (protilátka proti tomuto proteinu), která je v dalším kroku rozpoznána sekundární protilátkou za vzniku charakteristického zbarvení v oblasti odpovídající velikosti daného proteinu (Kamel, Saad and Sarhan, 2013); metoda byla využita např. při diagnostice *F. hepatica*, k reakci pozitivních sér s antigenem (ESP) došlo v oblasti 17 a 23kDa, které tak lze považovat za specifické pro tento druh parazita (Escalante et al., 2011)

V současné době jsou při diagnostice často využívány právě metody molekulární biologie a imunologické metody, pomocí kterých lze rozpoznat infekci již v akutním stadiu (Marcilla, Bargues and Mas-Coma, 2002; Salimi-Bejestani et al., 2005; McGarry et al., 2007; Gonzales Santana et al., 2013). Značným problémem v případě imunologických metod je zkřížená reaktivita mezi jednotlivými druhy parazitů, a tedy omezená specifita reakce (Martínez-Sernández et al., 2018; Meshgi et al., 2018).

Stanovení jaterních enzymů patří mezi metody nespolehlivé. Zvýšené hodnoty ukazují na poškození jater, ke kterému však může docházet nejen při parazitární infekci, ale také v případě jiných onemocnění (hepatitida). Příkladem jaterních enzymů, jejichž hodnota je zvýšena při poškození jaterního parenchymu jsou – aspartátaminotransferáza (AST), alaninaminotransferáza (ALT), laktátdehydrogenáza (LD), alkalická fosfatáza (ALP), gamma-glutamyltransferáza (GMT) a glutamátdehydrogenáza (GMD). Zvýšené hladiny těchto jaterních enzymů mohou však poukazovat i na poškození jiných orgánů (Racek, 2006; Dorchies, 2007).

Hematologické vyšetření může stejně jako stanovení jaterních enzymů poukázat na parazitární onemocnění. Jedním z ukazatelů nákazy fasciolidními motolicemi může být např. anémie, která je důsledkem toho, že se parazit živí hostitelskou krví. Anémie však

může mít další příčiny např. krvácení, nebo nedostatek vitamínu B12 (Jíra, 1998; Doubek, 2003). Dalším ukazatelem parazitárních chorob je stanovení protilátek IgE, které jsou však zvýšené např. i u alergiků (Toman et al., 2009).

3.2.1 Exkrečně-sekreční produkty (ESP)

Exkrečně-sekreční produkty parazitů zahrnují směs molekul, které jsou vylučovány ze střeva, exkrečního póru nebo povrchu parazita, např. tegumentu. Hrají důležitou roli v interakci mezi parazitem a hostitelem, při trávení krve nebo při migraci parazitů hostitelskou tkání (Berasáin et al., 1997). Mohou také chránit parazita před obrannou reakcí hostitele (Lightowlers and Rickard, 1988; Di Maggio et al., 2016).

Pomocí proteomické studie *F. hepatica* bylo zjištěno, že u dospělých motolic jsou nejvíce zastoupenou skupinou v ESP proteolytické enzymy (peptidázy), až 83 %. Další skupiny tvoří inhibitory proteáz, proteiny účastnící se metabolismu hemoglobinu, energetického metabolismu a transportu (Di Maggio et al., 2016). Na základě katalytické aktivity můžeme proteázy dělit na serinové, cysteinové, threoninové, aspartátové, metalopeptidázy a glutamátové peptidázy. Nejvíce zastoupenou složkou ESP fasciolidních motolic jsou cysteinové proteázy, do kterých jsou zařazeny katepsiny, legumain aj. (Di Maggio et al., 2016). Katepsiny se účastní trávení krve a jsou také zapojeny do modulace imunitní odpovědi hostitele (Berasáin et al., 1997; Berasain et al., 2000). K regulaci proteáz slouží jejich inhibitory chránící tak parazita i hostitele před poškozením (Knox, 2007). V případě *F. hepatica* jsou to serpiny – inhibitory serinových proteáz vykazující antikoagulační a imunomodulační vlastnosti (Zang and Maizels, 2001; Di Maggio et al., 2016). V současnosti je pro *F. hepatica* popsán jeden Kunitz inhibitor proteáz, jehož aktivita zřejmě potlačuje prozánětlivé cytokiny (Bozas et al., 1995; Falcón et al., 2014). S regulací proteáz souvisí také další nalezené inhibitory – cystatin a stefin (Di Maggio et al., 2016).

Další důležitou složkou ESP, zejména při migraci a adaptaci parazita na hostitelské prostředí, jsou proteiny zahrnuté do antioxidačního a detoxikačního systému parazita. Tyto proteiny fungují jako primární obrana proti volným radikálům, NO a superoxidům, které jsou uvolňovány z makrofágů, eozinofilů a neutrofilů. U *F. hepatica* zastává detoxikační funkci peroxiredoxin a thioredoxin. Do skupiny antioxidantů patří také glutathion-S-transferáza (GST) a proteiny vázající mastné kyseliny (FABP)

(Williams *et al.*, 2013; Lu and Holmgren, 2014; Cwiklinski *et al.*, 2015). Některé ESP mohou indukovat imunitní odpověď hostitele a lze je tedy využít při diagnostice helmintů včetně fasciolidních motolic (Lightowers and Rickard, 1988; Cervi *et al.*, 2009; White and Artavanis-Tsakonas, 2012).

3.2.2 Možnosti využití ESP při diagnostice fasciolidních motolic

Exkrečně sekreční produkty jsou v současnosti předmětem mnoha studií. Nejčastěji jsou využívány jako antigeny při nepřímé diagnostice fasciolózy metodou ELISA. Tato metoda byla hodnocena např. u skotu v Peru, kde je prevalence fasciolózy až 95 %. Senzitivita metody byla 98 % a specifita 96 %, zároveň zde nedošlo k žádné zkřížené reakci s některými zástupci nematodů, jimiž byl skot také infikován (Salimi-Bejestani *et al.*, 2005). Obdobně byl zkoumán účinek ESP v Íránu (Rokni *et al.*, 2002), kde byla senzitivita 100 % a specifita 98,9 %. Využívání ESP jako antigenu pro serologické vyšetření nese ale i řadu problémů. Mezi hlavní problémy patří dostupnost ESP závislá na dostupnosti živých motolic a standardizace testů v diagnostických laboratořích (Gottstein *et al.*, 2014). V posledních letech je snaha, ze směsi ESP, purifikovat jednotlivé proteiny, které by měly mít specifitu i senzitivitu vyšší (Rokni *et al.*, 2002). Aby byl výtěžek purifikovaného proteinu co nejvyšší je třeba využívat proteiny, které jsou v ESP fasciolidních motolic hojně zastoupené.

Katepsin L tvoří hlavní složku ESP u *F. hepatica* (Robinson *et al.*, 2009) a vykazuje imunomodulační účinky, proto je také často připravován v rekombinantní podobě a zkoumán jeho účinek. V oblasti Altiplano, kde je prevalence fasciolózy velmi vysoká, byla zkoumána séra z 64 jedinců. Detekce vajíček ve stolici, a tedy chronické stadium infekce, bylo potvrzeno u 26 lidí, zatímco pomocí testu ELISA bylo označeno 38 lidí za séropozitivní. To potvrzuje vynikající potenciál katepsinu pro vývoj standardizovaných testů (O'Neill *et al.*, 1999). Význam katepsinu L byl dále zkoumán u pacientů infikovaných *F. hepatica*. Senzitivita testu byla 99,9 %, stejně jako specifita (Gonzales Santana *et al.*, 2013). U skotu infikovaného *F. hepatica* vykazoval katepsin L také 100% senzitivitu (Kuerpick *et al.*, 2013). Účinek katepsinu L v rekombinantní podobě byl zkoumán samostatně, ale i v kombinaci např. se saposiny (konkrétně saposin-like-protein-2 – recSAP2). Jelikož oba tyto proteiny vykazují podobně vysokou specifitu, předpokládá se, že kombinace obou proteinů by mohla poskytnout ještě vyšší diagnostickou citlivost. V tomto případě byla pro sérodiagnostiku fasciolózy využita séra

od pacientů s fasciolózou, od pacientů, u kterých byli prokázáni jiní parazité (např. echinokokóza, toxokaróza, trichinelóza atd.) a od onkologických pacientů (pacienti s leukemií, rakovinou GIT, prsu, prostaty, aj.). Cílem bylo sledování zkřížené reaktivity. Vzorky byly získány z oblastí střední Evropy, tedy z oblastí s nízkou prevalencí fasciolózy. Nejlepší specifitu vykazoval recSAP2 a to 99 %. Zkřížená reaktivita byla prokázána pouze v jednom případě u pacienta s alveolární echinokokózou. Citlivost tohoto proteinu byla 87 %, zatímco kombinace obou proteinů (recCL a recSAP2), která se zdála slibná, vykazovala senzitivu pod 77 % (Gottstein *et al.*, 2014).

Mezi hlavní problémy při sérodiagnostice patří zkřížená reaktivita antigenů. Problém nastává také u onkologických pacientů, u nichž se tvoří specifické protilátky, z nichž některé mohou být běžné při parazitární nákaze helminty (Gottstein *et al.*, 2014). Dosud byly vyvinuty nástroje pro diagnostiku některých zástupců helmintů, ale rutinní test pro detekci fasciolózy stále chybí. Testována je řada rekombinantních antigenů, ale dosud u nich neproběhla validace podle standardů, jenž by vyhovovala všem normám v rutinních diagnostických laboratořích (Gottstein *et al.*, 2014).

Kromě katepsinů jsou předmětem několika studií i další proteiny nacházející se v ESP. Např. FABP (protein vázající mastné kyseliny) vykazující poměrně vysokou citlivost u ovcí infikovaných *F. hepatica*, zatímco např. GST (glutathion-S-transferáza), jejíž účinek byl v této studii také zkoumán, vykazoval specifitu i senzitivu nízkou, navíc se zkříženou reakcí s nákazou echinokokózy (Mokhtarian *et al.*, 2018). Antigenní účinky některých proteinů nacházejících se v ESP fasciolidních motolic byly zkoumány i u jiných trematodů. Například rekombinantní cyklofilin-A, nebo legumain, které byly nalezeny i u fasciolidních motolic (Cantacessi *et al.*, 2012a; Di Maggio *et al.*, 2016), by mohly sloužit k diagnostice pacientů napadených motolicí *Clonorchis sinensis* (Ju *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011).

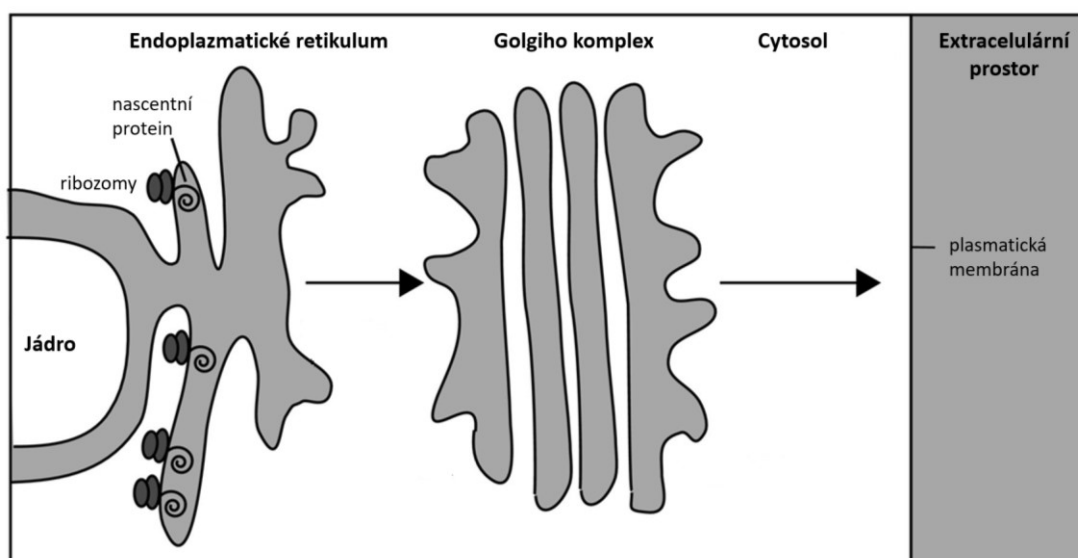
3.2.3 Vlastnosti sekretovaných molekul

Sekretované proteiny se podílejí na řadě důležitých biologických procesů – buněčná adheze, proliferace, migrace, přežití a obrana patogena, virulence, imunitní odpověď (Bonin-Debs *et al.*, 2004). Sekretom parazita (produkty vylučované z buňky, parazita, nebo jiného organismu), může být bohatým zdrojem proteinových antigenů jenž mohou být využity pro diagnostiku parazitóz nebo při vývoji terapeutik (Leclipteux *et al.*, 1998; Sriveny *et al.*, 2006; El Ridi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Ranganathan and Garg, 2009; Sun *et al.*, 2015).

V eukaryotické buňce jsou na základě různých vlastností, viz dále, proteiny sekretovány prostřednictvím klasické sekreční dráhy. Existuje však mnoho proteinů, které tyto vlastnosti nemají a jejich sekrece je popisována jako tzv. alternativní (neklasická) sekreční dráha.

Klasická sekreční dráha

Ribozomy syntetizující proteiny se navážou na drsné endoplasmatické retikulum (ER). Postupně jsou tyto proteiny translokovány do lumen ER, kde jsou glykosylovány a skládány. Správně poskládané proteiny se mohou přesouvat do Golgiho komplexu, v němž může dojít k dalším posttranslačním modifikacím (fosforylace, ubiquitinace atd.). Proteiny jsou nakonec přesunuty do sekrečních váčků, které fúzí s buněčnou membránou a dochází tak k exocytóze, kdy je obsah váčku vyloučen z buňky do vnějšího prostředí (Lodish *et al.*, 1999). Klasická sekreční dráha je znázorněna na obr. 3.



Obrázek 3 - Schéma pro klasickou sekreční dráhu: ribozomy syntetizující proteiny jsou navázány na endoplazmatické retikulum (ER), proteiny jsou translokovány do lumen ER, následně do Golgiho komplexu a nakonec se dostávají vnějšího prostředí (Lodish *et al.*, 1999)

Protein vylučovaný klasickou sekreční dráhou by měl obsahovat signální sekvenci tj. 15–30 hydrofobních aminokyselin na N-konci proteinu. Zastoupení těchto aminokyselin se u jednotlivých proteinů liší, avšak několik jich zůstává charakteristických a slouží tak k rozpoznání signální sekvence. Signální sekvence má obvykle tři rozlišitelné oblasti, tj. N-terminální oblast obsahující pozitivně nabitě aminokyseliny (např. Lysin, Arginin, Histidin), hydrofobní oblast obsahující hydrofobní aminokyseliny (např. Glycin, Alanin, Leucin, Isoleucin, Prolin) a C-terminální oblast obsahující polární nenabitě aminokyseliny (např. Serin, Threonin, Cystein) (Bendtsen *et al.*, 2004). Vylučovaný protein by dále neměl obsahovat transmembránovou doménu, jejíž přítomnost dokazuje, že se jedná o membránový, nikoliv sekretovaný protein. Kromě proteinů, které směřují ven z buňky vznikají také proteiny vázající se na membránu mající různý počet transmembránových domén. Transmembránové domény v membránových proteinech tvoří α -helixy skládající se do oddělených domén, které hrají různé funkční role (receptory, transportéry aj.) (Oberai *et al.*, 2006; Fagerberg *et al.*, 2010). Transmembránové domény se skládají převážně z nepolárních aminokyselin a plasmatickou membránou mohou procházet jednou i vícekrát (Wayne, 2012). Podle zastoupení jednotlivých aminokyselin v proteinu lze také definovat např. subcelulární lokalizaci proteinu, opět dle charakteristické sekvence. Např. pro proteiny směřované do

mitochondrií jsou typické sekvence bohaté na aminokyseliny Alanin a Serin (Emanuelsson *et al.*, 2000).

Alternativní sekreční dráha

Existuje také mnoho proteinů, které nemají typické molekulární vlastnosti předznamenávající sekreci, a to zejména signální sekvenci, která je důležitým předpokladem pro predikci bioinformatickými nástroji. Jejich sekrece je popisována jako tzv. alternativní sekreční dráha. Takové proteiny mohou být vylučovány různými mechanismy např. přímou translokací proteinu přes plazmatickou membránu zřejmě s pomocí membránových transportérů. Další možností je sekrece pomocí exosomů – membránových váčků (Théry, 2011). Alternativní sekreční dráhy jsou popisovány např. u bakterií (Bendtsen *et al.*, 2005), ale také u některých proteinů vyskytujících se v ESP fasciolidních motolic např. thioredoxin (Rubartelli *et al.*, 1992) nebo glutathion-S-transferáza, či FABP (fatty-acid-binding-protein) (Cwiklinski *et al.*, 2015).

3.2.4 Syntetické antigenní epitopy

S rozvojem bioinformatické analýzy dochází v poslední době k vyhledávání a přípravě syntetických antigenních epitopů (specifická vazebná místa reagující s protilátkami) u známých proteinů nacházejících se v ESP. Pro diagnostiku motolice *F. gigantica* byly predikovány a zhotoveny dva peptidy katepsinu L (Meshgi *et al.*, 2018). Jeden z peptidů byl vybrán na základě topologických vlastností a homologie s proteázou podobnou katepsinu L, které byly ověřeny již dříve (Cornelissen *et al.*, 1999). Druhý peptid byl predikován také z katepsinu L pomocí současných bioinformatických nástrojů. Oba peptidy byly využity pro sérodiagnostiku zvířat v Íránu. Jednalo se o zvířata nakažená fasciolózou, dikroceliózou, hydatiózou aj. (Meshgi *et al.*, 2018). Peptid identifikovaný v dané studii (Cornelissen *et al.*, 1999), vybraný na základě homologie s katepsinem L, vykazoval nižší specifitu i senzitivitu. Druhý peptid predikovaný pomocí bioinformatických nástrojů vykazoval velmi vysokou účinnost a byl tak označen jako vhodný antigen pro diagnostiku fasciolózy (Meshgi *et al.*, 2018).

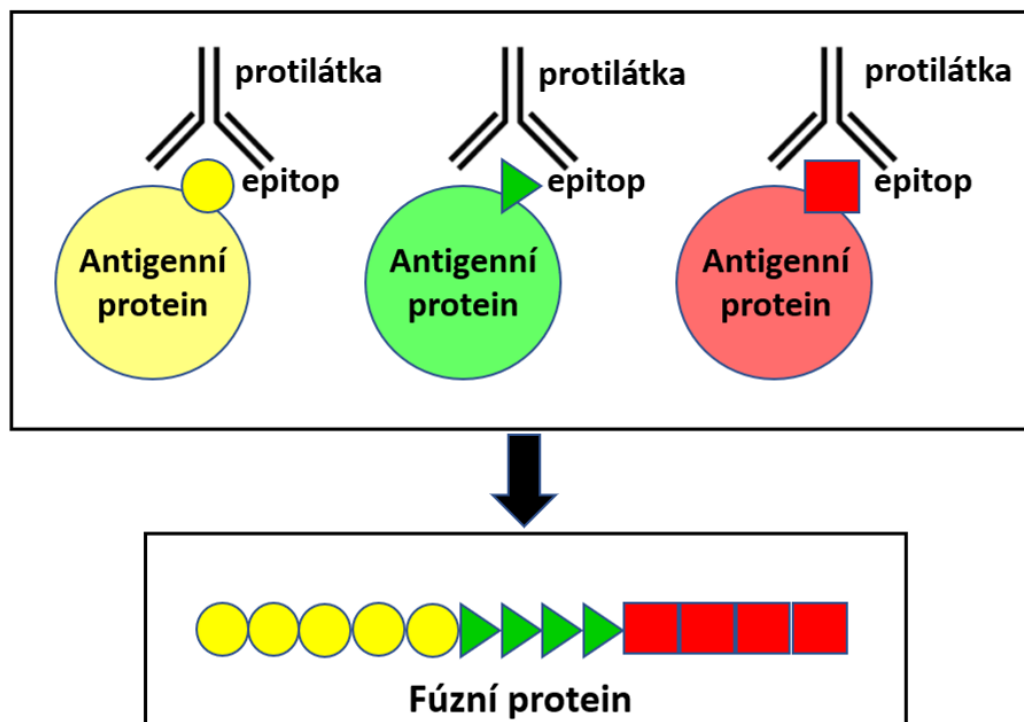
Syntetické peptidy byly dále využity i u jiných helmintárních nákaz např. u pacientů s echinokokózou (List *et al.*, 2010) nebo u *Taenia saginata* při diagnostice bovinní cysticerkózy (Ferrer *et al.*, 2003).

Úspěšně jsou syntetické peptidy aplikovány při diagnostice virových a bakteriálních infekcí. Ve srovnání s parazity mají bakterie i viry menší genom umožňující snadnější a rychlejší identifikaci imunodominantních peptidů (List *et al.*, 2010). Kombinace dvou peptidů představující imunodominantní epitopy EBV (virus Epstein-Barrové) se ukázala být slibná pro primární diagnózu tohoto onemocnění (Fachiroh *et al.*, 2006). Syntetické peptidy odpovídající imunodominantním oblastem jsou využívány i při detekci protilátek HIV a často vykazují až 100% citlivost (Manocha *et al.*, 2003). Mnoho onemocnění lze diagnostikovat rutinními metodami, které často bývají zastaralé a nespecifické. Je tedy nutné vyvíjet nové diagnostické metody, tak jako např. u tuberkulózy, kterou běžně můžeme diagnostikovat pomocí mikroskopického vyšetření. Vyvíjen je proto nový test založený na identifikaci imunodominantních epitopů, který by v budoucnu mohl mikroskopické metody nahradit (Shen *et al.*, 2009).

Ačkoliv jsou rekombinantní proteiny získávány poměrně snadno, jsou náchylné k degradaci. Často dochází k nesprávnému skládání a produkce takových proteinů je obtížná. Oproti tomu syntéza peptidů nabízí vhodnou alternativu. Syntetické peptidy jsou, vzhledem k využívání krátkých úseků s vysokou homologií pro daný druh parazita, relativně stabilní a eliminují vznik zkřížené reakce s jinými patogeny a tím zvyšují specifitu diagnostické metody (Shen *et al.*, 2009).

3.2.5 Fúzní proteiny

Fúzní proteiny jsou biomolekuly skládající se ze dvou a více peptidů/epitopů syntetizovaných do jednoho konstruktu (Yu *et al.*, 2015) viz obr. 4.



Obrázek 4 - Schéma konstrukce fúzního proteinu: jednotlivé antigenní proteiny obsahují specifické antigenní epitopy, na něž se specificky váže příslušná protilátka; na základě definování příslušných antigenních epitopů je pak možné připravit jeden fúzní protein

Pro tvorbu fúzního proteinu v rekombinantní podobě je důležité zvolit specifickou afinitní značku umožňující purifikaci (např. histidinová kotva). Existují také větší značky, které mohou být v závěrečné fázi purifikace odstraněny např. Glutathion-S-transferáza (GST) nebo Maltose-binding protein (MBP), který je díky své molekulové hmotnosti 42,5 kD, často využívaný jako proteinový nosič (Moon *et al.*, 2010). Produkce fúzního proteinu bez narušení jeho trojrozměrné struktury je dalším důležitým krokem při jeho výrobě (Kufner and Lipps, 2013).

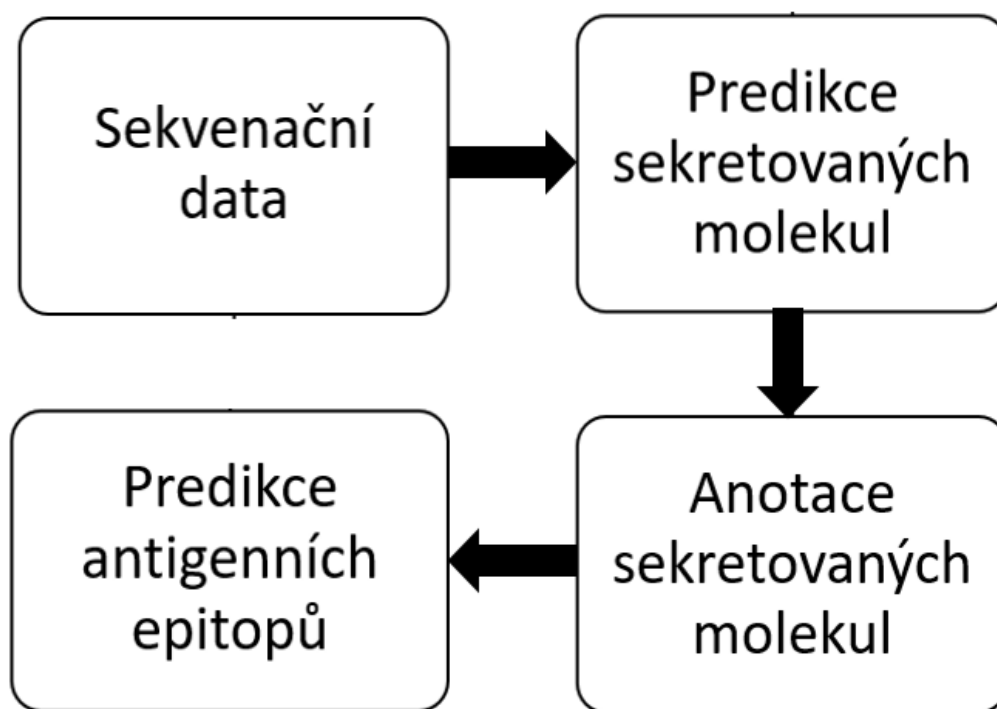
Pro využití v imunodiagnostice mohou být fúzní proteiny navrženy tak, aby dosáhly co nejlepších vlastností a funkcí. Umělé fúzní proteiny se tak mohou stát např. novou skupinou pro tvorbu léčiv (Berger *et al.*, 2015). Studie naznačují, že fúzní protein konstruovaný ze dvou antigenních oblastí imunodominantních pro *Plasmodium*

falciparum (PfMSP-1₁₉ a PfMSP-3₁₁) by mohl být využit pro přípravu vakcíny proti malárii (Gupta *et al.*, 2014). U *Schistosoma japonicum* pak byly vytvořeny čtyři fúzní proteiny, které by též mohly být využity ke konstrukci vakcíny (Xu *et al.*, 2009).

Zájem o tvorbu fúzních proteinů je i v oblasti humánní medicíny. Fúzní protein, který by obsahoval protinádorové peptidy účinné proti rakovině prsu (p28 a NRC) by mohl vyvolat specifické cytotoxické účinky (Soleimani *et al.*, 2016). Problémem u těchto peptidů je najít vhodný linker, což je krátká aminokyselinová sekvence sloužící k oddělení jednotlivých proteinových domén a zabráňující nežádoucím interakcím mezi těmito doménami (Reddy Chichili *et al.*, 2013).

3.3 Bioinformatická analýza

Bioinformatická analýza se zabývá ukládáním, vyhledáváním a analýzou biologických dat využívaných pro studium biologických systémů. Představuje kombinaci několika vědních oborů jako je biologie, matematika, počítačové vědy nebo statistika a hraje např. klíčovou roli při zpracování a interpretaci sekvenčních dat. U velkých datových sad vyžaduje bioinformatické zpracování přístup k výkonným počítačům a znalost programovacích jazyků. Proto je kladen důraz na vývoj uživatelsky přívětivého rozhraní (Mehmood, 2014). Bioinformatické nástroje mají širokou škálu využití, z hlediska biologie a parazitologie mohou být využity např. pro *in silico* predikci antigenních molekul za účelem jejich následného využití v oblasti diagnostiky a terapie parazitárních chorob (Gottstein *et al.*, 2014; Meshgi *et al.*, 2018). Na rozdíl od práce v laboratoři, která je časově náročná a často nákladná, poskytují bioinformatické nástroje rychlou a levnou alternativu, a to zejména díky existenci volně dostupných dat (genomová, transkriptomová, proteomová), která jsou často využívána jako vstupní soubory pro predikci antigenních molekul (Mehmood, 2014). Postup při identifikaci molekul schopných vyvolat imunitní odpověď je znázorněn na obr. 5.



Obrázek 5 - Stručné schéma predikce antigenních proteinových molekul

3.3.1 Sekvenování nové generace

Sekvenování nukleových kyselin zahrnuje metody, jimiž lze zjistit pořadí nukleových bází v jejich sekvenci (Raclavský, 1998). Od 70. let 20. století dochází k rozvoji sekvenačních metod. Nejstarší sekvenační metody jsou označovány jako sekvenování první generace (např. Sangerova metoda), pomocí které lze sekvenovat relativně dlouhé kvalitní sekvence od 500-1000 bp (Besser *et al.*, 2018). Revoluci v metodách sekvenování způsobily technologie sekvenování nové generace (NGS), první metodou byla tzv. pyrosekvenace (454 Life Sciences), umožňující detekci tisíců krátkých sekvencí v jediném kroku (Margulies *et al.*, 2005).

V současnosti se nejčastěji používají techniky krátkého čtení sekvencí označované jako sekvenování druhé generace, při nichž během krátké doby dochází k opakovanému sekvenování genomu v malých náhodných sekvencích, čímž vznikají velké datové soubory (Schadt *et al.* 2010). Existují různé platformy zahrnující několik společných kroků – příprava knihovny DNA, příprava matrice (amplifikace DNA) a automatizované sekvenování (Vincent *et al.*, 2017).

- Illumina = princip spočívá v sekvenování syntézou komplementárního vlákna a detekci reverzibilně blokových terminátorových nukleotidů na bázi fluorescence (Bentley *et al.*, 2008); ze všech dostupných technologií sekvenování nové generace vykazuje Illumina nejvyšší přesnost; na této platformě je založeno několik přístrojů lišící se zejména principem sekvenace, kapacitou a délkou čtené sekvence (Besser *et al.*, 2018)
 - MiniSeq (délka čtení až 150 bp, kapacita 1,7-7,5 Gb, MiSeq (délka čtení až 300 bp, kapacita 0,3-15 Gb), tyto sekvenační přístroje jsou cenově dostupné a využívány např. v diagnostických laboratořích (Besser *et al.*, 2018)
 - NextSeq (délka čtení až 150 bp, kapacita 10-120 Gb), HiSeq (délka čtení až 250 bp, kapacita 10-1000 Gb), NovaSeq (délka čtení až 150 bp, kapacita 2000-6000 Gb), tyto sekvenační přístroje jsou výrazně dražší, a navíc vyžadují automatizaci pro přípravu DNA knihovny (Besser *et al.*, 2018)
- IonTorrent (Thermo fisher scientific) = princip spočívá opět v sekvenování syntézou komplementárního vlákna, ale detekce je založena na měření vodíkových iontů uvolněných během DNA polymerace (Rothberg and Myers, 2011); cenově je tato platforma obdobou Illumina, ale náklady na vzorek, který je potřeba sekvenovat jsou mnohem vyšší (zdlouhavá příprava DNA knihovny) navíc má tato platforma vysokou chybovost; na této platformě je opět založeno několik sekvenačních přístrojů (Besser *et al.*, 2018)
 - PGM (délka čtení až 400 bp, kapacita 0,08-2 Gb), S5 (délka čtení až 400 bp, kapacita 0,6-15 Gb)
 - Proton (délka čtení až 200 bp, kapacita 10-15 Gb)

Aby bylo možné zaměřit jednotlivé molekuly DNA bez nutnosti jejich amplifikace pomocí PCR, byly navrženy nové platformy tzv. sekvenování třetí generace (Schadt *et al.*, 2010).

- Pacific BioSciences = principem je sekvenování v reálném čase založené na syntéze za použití nukleotidů značených fluorescenčními barvami, sekvenování však pokračuje uložením jednořetězcových molekul DNA do jamek destičky, kde je imobilizována DNA polymeráza; během několika hodin lze pomocí této platformy získat fragmenty dlouhé až 20 kb; provozní výkon této platformy je však nízký a náklady na vzorek jsou vysoké, vysoká je také chybovost této metody (až 15%) (Rhoads and Au, 2015; Besser *et al.*, 2018)

- Oxford Nanopore = nově vyvíjená platforma představuje nejmenší sekvenační zařízení, které je v současné době k dispozici (připojení jako standardní USB – nízké hardwarové požadavky a jednoduchá konfigurace) (Besser *et al.*, 2018); k dispozici je komerční přístroj Minion
 - Minion (délka čtení až 100 kb), identifikace bází DNA je založena na měření změn elektrické vodivosti; problémem je opět chybovost této technologie, která je až 38 %, dochází však ke stálému zlepšování, kdy lze dosáhnout chybovosti 5-15 % (Stoddart *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2016)

DNA čipy patří k dalším sekvenačním metodám. Principem je imobilizace různých DNA sekvencí na povrch destičky (označované jako čip) a reakce těchto sekvencí s označenými cíli DNA. (Govindarajan *et al.*, 2012). Cílové části DNA jsou identifikovány jejich fluorescenční emisí pomocí laserového paprsku. Tato technika je velmi rychlá a specifická, ale zároveň nákladná (Govindarajan *et al.*, 2012). Dna čipy jsou využívány např. pro mapování genetických abnormalit u širokého spektra nádoru např. karcinom močového měchýře (Veltman *et al.*, 2003)

Hlavní výhodou sekvenování nové generace je schopnost osekvenovat za krátkou dobu velké množství fragmentů nukleových kyselin za poměrně nízkou cenu. Toho může být využíváno např. při sekvenaci genomu nebo transkriptomu (Metzker, 2010).

- genom = veškerá genetická informace daného organismu (Greenbaum *et al.*, 2001), v současnosti je studium genomů helmintů předmětem mnoha publikací (50 Projekt *Helminth Genomes (50HGP) Institut Wellcome Sanger*, 2018), dostupné genomy helmintů (105 genomů pro Nematoda a 33 genomů pro Platyhelminthes) lze najít na stránce WormBase Parasite (WormBase ParaSite, 2018)
- transkriptom = soubor veškerých transkriptů (mRNA) ve zkoumaném vzorku; na rozdíl od genomu je dynamickým souborem, který se mění v závislosti na čase (Greenbaum *et al.*, 2001), u zástupců z čeledi fasciolidae byl kompletní transkriptom dospělců definován pro *F. hepatica* (Young *et al.*, 2010), *F. gigantica* (Young *et al.*, 2011) i *F. magna* (Cantacessi *et al.*, 2012a)
- proteom = soubor veškerých proteinů ve zkoumaném vzorku v daném čase, u fasciolidních motolic identifikován pro *F. magna* (Cantacessi *et al.*, 2012a), *F. hepatica* (Di Maggio *et al.*, 2016)

Pokroky v oblasti genomiky, transkriptomiky a proteomiky jsou významné pro lepší pochopení parazitických organismů z hlediska jejich vývoje, reprodukce, přežití v hostitelském organismu, interakce s hostitelem a patogenity. Tyto pokroky mají také potenciál pro nové přístupy v léčbě, a diagnostice parazitárních chorob (Brindley et al., 2009; Cantacessi et al., 2012b). Genom, transkriptom a proteom mohou být tak využity pro predikci molekul schopných vyvolat imunitní odpověď hostitele. Typickým příkladem takových molekul jsou sekretované proteiny (Lightowlers and Rickard, 1988; Jenkins et al., 2005; El Ridi et al., 2007).

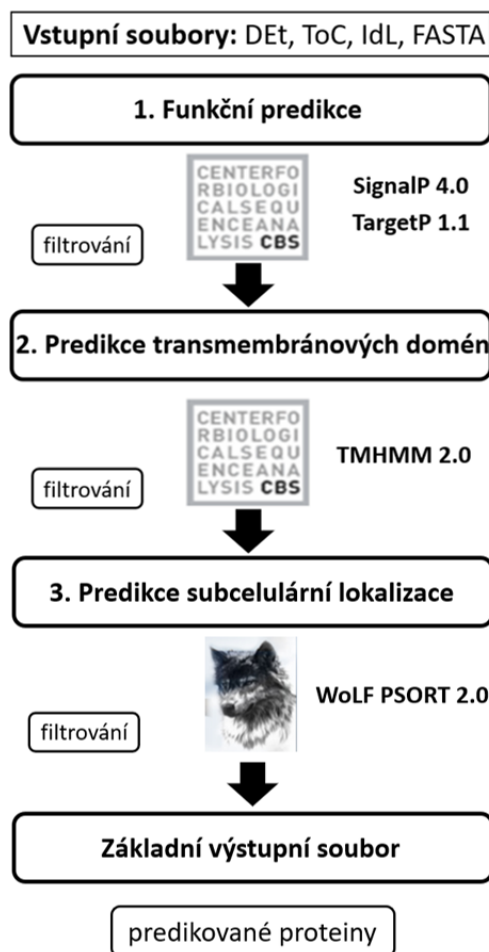
3.3.2 Predikce sekretovaných molekul

Predikci sekretovaných molekul lze rozdělit na několik částí. Nejprve je nutné získat vstupní soubor (vstupní data), ve kterém je možné sekretované molekuly hledat. Takovým vstupním souborem může být např. genom, transkriptom, proteom konkrétního organismu viz kapitola 3.3.1. Pro predikci jsou dále využívány bioinformatické nástroje, které identifikují sekretované molekuly na základě jejich vlastností viz kapitola 3.2.3. Bioinformatické nástroje, které jsou pro predikci sekretovaných molekul využívány, znázorňuje tab. 2.

Tabulka 2 – Příklady bioinformatických nástrojů využívaných pro predikci sekretovaných molekul

Vlastnost sekretované molekuly	Bioinformatický nástroj	Odkaz
Predikce signální sekvence	SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Predikce transmembránových domén	TMHMM HMMTOP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ http://www.enzim.hu/hmmtop/
Predikce subcelulární lokalizace	TargetP WolfPSORT	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/ https://www.genscript.com/wolf-psort.html
Predikce proteinů sekretovaných alternativní sekreční dráhou	SecretomeP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/

Pro lepší reprodukovatelnost je snaha o sdružování a vzájemné propojení jednotlivých predikčních nástrojů, které tak mohou tvořit ucelený program sloužící k predikci sekretovaných molekul. Takovým nástrojem je např. PECAS (Prokaryotic and Eukaryotic Classical Analysis of Secretome). Volně dostupný nástroj PECAS sdružuje několik bioinformatických nástrojů, které jsou často využívány jednotlivě (SignalP, TargetP, WolfPSORT, TMHMM) (Cortazar *et al.*, 2015). Způsob, kterým dochází k predikci sekretovaných molekul znázorňuje obr. 6.



Obrázek 6 - Schéma predikce sekretovaných proteinů pomocí nástroje PECAS: vstupní soubory DEt, ToC (formát tabulek), IdL (identifikační list), FASTA (textový formát peptidových/nukleotidových sekvencí); funkční predikce probíhá pomocí nástrojů SignalP (predikce signální sekvence) a TargetP (predikce subcelulární lokalizace); predikce transmembránových domén pomocí nástroje TMHMM a predikce subcelulární lokalizace založené na funkčních motivech pomocí WoLF PSORT; výsledkem je výstupní soubor v podobě predikovaných proteinů (Cortazar et al., 2015)

Vstupním souborem pro predikci sekretovaných molekul může být např. transkriptom ve formátu FASTA (textový formát reprezentující peptidové nebo nukleotidové sekvence molekul). Nejprve je nutné zvolit si nastavení pro predikci (mezí hodnoty určující pravděpodobnost, že daný protein bude sekretovaný), poté lze přikročit k jednotlivým fázím predikce.

1. Funkční predikce = identifikace molekul se signální sekvencí (SignalP) a N-terminální sekvencí určující jejich subcelulární lokalizaci (TargetP) (Emanuelsson *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2011); vybrané molekuly postupují do další fáze (Cortazar *et al.*, 2015)
2. Predikce transmembránových domén pomocí nástroje TMHMM (počet domén je opět zadán v nastavení) (Krogh *et al.*, 2001); všechny proteiny mající vyšší počet domén, než je počet zadaný, jsou odstraněny (Cortazar *et al.*, 2015)
3. Predikce subcelulární lokalizace pomocí nástroje WoLF PSORT je založena na složení aminokyselin a na funkčních motivech, které jsou převáděny na číselné údaje (Horton *et al.*, 2007); všechny proteiny, které mají hodnotu nižší, než je hodnota zadaná jsou odstraněny (Cortazar *et al.*, 2015)
4. Základní výstupní soubor obsahující seznam predikovaných proteinů je výsledkem této predikce (Cortazar *et al.*, 2015)

PECAS tedy umožňuje snadnou a rychlou predikci proteinů sekretovaných klasickou sekreční cestou (Cortazar *et al.*, 2015). Hlavní výhoda spočívá ve snadné predikci bez nutnosti znalosti příkazového řádku a dále velký objem vstupních dat, které lze pro analýzu využít. PECAS byl prozatím využit např. při tvorbě databáze sekretovaných proteinů u obratlovců (Cortazar *et al.*, 2017) nebo při anotaci genomu mušle *Bathymodiolus thermophilus* (Ponnudurai *et al.*, 2017).

Další částí predikce sekretovaných molekul je jejich anotace, tedy vyhledání sekvenční podobnosti predikovaného sekretovaného proteinu s již identifikovanými proteiny. Nástrojem pro vyhledání homologních sekvencí je BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), který je schopen porovnávat nukleotidové nebo proteinové sekvence se sekvenčními databázemi a vypočítat na základě nastavených kritérií míru shody. Podobnost jednotlivých sekvencí můžeme vyhledávat pomocí množství databází:

- NCBI (National Center for Biotechnology Information) = v databázi jsou zahrnuty výsledky sekvenačních dat a dále jsou zde uvedeny vědecké publikace, důležitá funkce této databáze je její využití pro BLAST
- KEGG (Koyto Encyclopedia of Genes and Genomes) = databáze obsahující rozsáhlé molekulární datové soubory kategorizované do proteinových rodin a biologických drah (Kanehisa *et al.*, 2016)

- UniProt (Universal Protein Resource) = databáze proteinových sekvencí zahrnující informace o funkci proteinu a sdružující výsledky sekvenovaných genomů, lze zde nalézt informace o patologických projevech souvisejících s proteinem nebo mutace, které je protein schopen způsobit; UniProt je databáze poskytující nejvíce anotací a je označována jako nejpoužívanější (UniProt Consortium, 2011)
- MEROPS (the Peptidase Database) = databáze peptidáz a jejich inhibitorů, každá peptidáza/inhibitor je v této databázi přiřazena do příslušné rodiny a klanu (Rawlings *et al.*, 2018)

Predikce sekretovaných proteinů parazita usnadňuje výběr molekul, které by mohly být využity, při sérodiagnostice, jako antigeny (Soria-Guerra *et al.*, 2015). Obecným problémem diagnostických metod je omezená specifita antigenů, kdy většinou dochází ke zkřížené reaktivitě s jinými druhy parazitů. V důsledku toho jsou využívány antigenní epitopy sekretovaných proteinů, které by měly vznik zkřížené reaktivity eliminovat. Jejich příprava je poměrně snadná, a navíc je opět můžeme predikovat pomocí bioinformatických nástrojů.

3.3.3 Predikce antigenních epitopů

S vývojem bioinformatiky spolu s pokroky v oblasti molekulární biologie a znalostí hostitelské imunitní odpovědi můžeme v současnosti identifikovat a připravit specifické antigenní epitopy (specifická vazebná místa reagující s protilátkami), které by mohly imunitní reakci organismu urychlit a zesílit. Antigenní epitopy mají obrovský potenciál při vývoji vakcín, diagnostice a léčbě různých onemocnění (Nuccitelli *et al.*, 2011; Soria-Guerra *et al.*, 2015; Mohammad *et al.*, 2016). O tom svědčí také navrhování fúzních proteinů, které mají v jediné molekule zahrnuto více specifických antigenních epitopů. Tyto proteiny tak představují velký potenciál v diagnostice parazitárních chorob (Rokni *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Kis *et al.*, 2015; Soleimani *et al.*, 2016).

V případě predikce antigenních epitopů je důležitá specifická imunita tvořená dvěma složkami (humorální a buněčnou). Buněčná složka zahrnuje T-lymfocyty, k jejichž aktivaci dochází za přítomnosti antigenu a B-lymfocyty, které postupně dozrávají v plazmatické buňky produkující protilátky. Humorální složkou specifické

imunity tvoří především protilátky a cytokiny, přičemž protilátky jsou zodpovědné za vyhledání a označení antigenu, který má být zničen. Protilátka se váže na povrch antigenu ve specifickém místě – epitop. Predikce antigenních epitopů by teda mohla pomoci k vytvoření molekuly, která bude snadno rozpoznávána protilátkami (Bartůňková and Paulík, 2005; Toman et al., 2009).

Při identifikaci antigenních epitopů se lze zaměřit na T-buněčné epitopy, které jsou rozpoznávány receptory T-lymfocytů. Tyto epitopy jsou v lineární formě vázány na MHC (hlavní histokompatibilní komplex) jehož funkcí je prezentace antigenu T-lymfocytům. Při setkání T-lymfocytů s antigenem se spouští specifická imunitní odpověď organismu. V současnosti existuje řada bioinformatických nástrojů pro predikci T-buněčných epitopů (Soria-Guerra *et al.*, 2015). V této práci však byly využity nástroje predikující B-buněčné epitopy. B-buněčné epitopy jsou rozpoznávány receptory B-lymfocytů. Reakce hostitelského organismu na antigen může vést ke specifické imunitní odpovědi, za kterou zodpovídají B-lymfocyty a jimi produkované protilátky (Bartůňková and Paulík, 2005), které jsou při diagnostice parazitárních infekcí zásadní (Charlier *et al.*, 2009; Acici *et al.*, 2015). Predikce B-buněčných epitopů by tak mohla být pro diagnostiku parazitárních onemocnění klíčová (Soria-Guerra *et al.*, 2015).

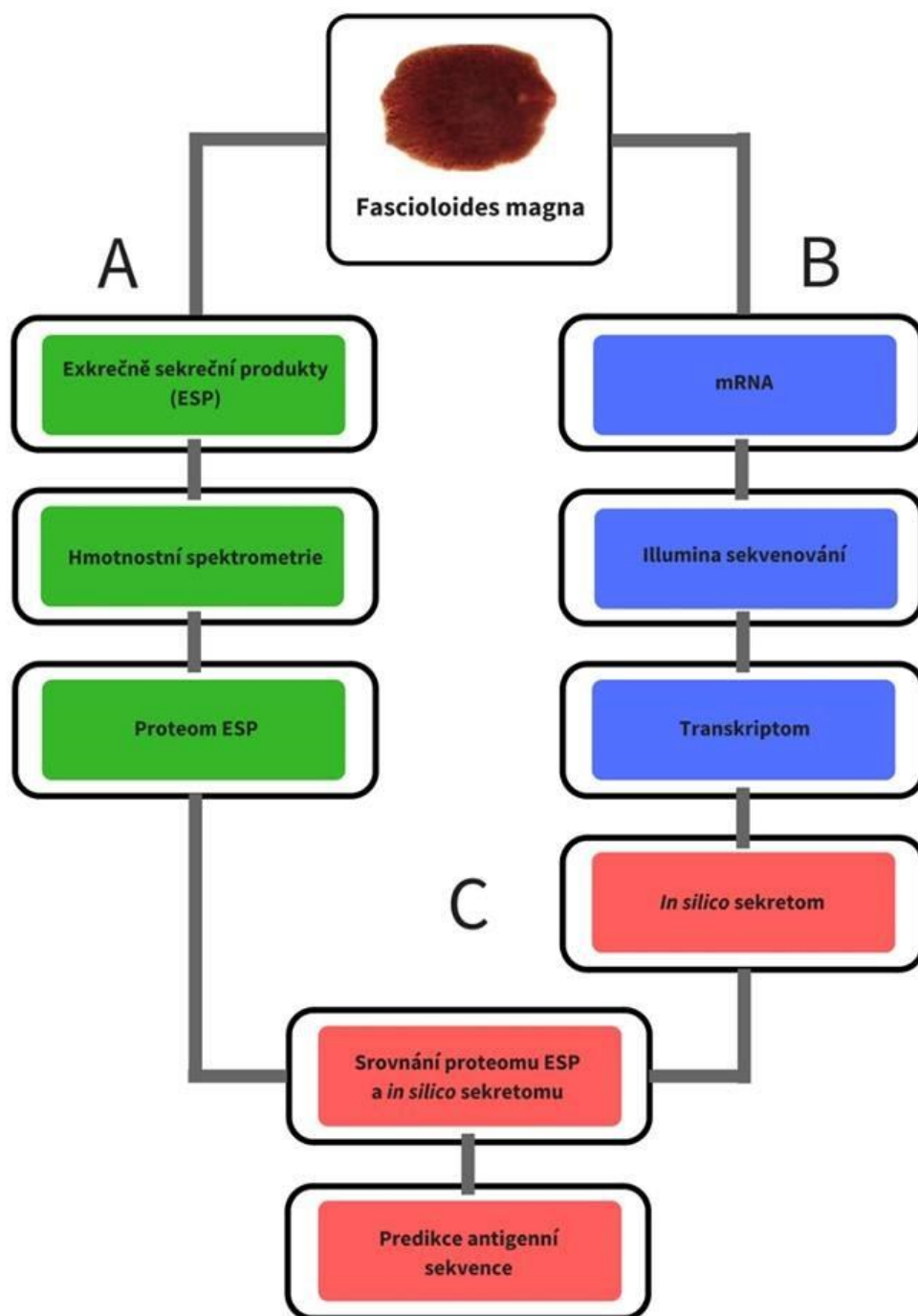
Predikce B-buněčných epitopů může být založena na vlastnostech aminokyselin, hydrofilitě, náboji a sekundární struktuře, nebo 3D struktuře antigenu (Soria-Guerra *et al.*, 2015). Mezi nástroje sloužící k predikci těchto epitopů patří např. BcePred (predikce založená na fyzikálně-chemických vlastnostech epitopů), BepiPred (predikce založená na skrytém Markovově modelu) nebo LBTOPE, který predikuje antigenní epitopy na základě využití datových souborů obsahující epitopy získané z imunitní epitopové databáze (IEDB) (Saha and Raghava, 2004; Singh, Ansari and Raghava, 2013; Soria-Guerra *et al.*, 2015; Vita *et al.*, 2015; Jespersen *et al.*, 2017). Výsledkem predikce je výčet krátkých sekvencí s určitým antigenním skóre. Bioinformatické nástroje využívané pro predikci T-buněčných epitopů i B-buněčných epitopů jsou podrobněji rozebrány v článku (Soria-Guerra *et al.*, 2015).

4 Metodika

Experimentální část této práce byla rozdělena na dva oddíly – bioinformatická analýza a laboratorní práce.

V bioinformatické části byly z transkriptomových dat predikovány molekuly sekretované z těla motolice *F. magna* – *in silico* sekretom. Dále bylo testováno, jak se *in silico* sekretom shoduje s reálným proteomem ESP (exkrečně sekreční produkty dospělců *F. magna*, identifikované pomocí hmotnostní spektrometrie) (Cantacessi *et al.*, 2012a). U sekretovaných transkriptů predikovaných *in silico* a zároveň identifikovaných laboratorně byly pomocí bioinformatických programů predikovány antigenní epitopy, které byly využity pro navržení fúzních proteinů. Postup práce týkající se bioinformatické části znázorňuje obecné schéma (obr. 7).

Principem laboratorní fáze této práce bylo na základě poznatků získaných bioinformatickou analýzou vytvořit rekombinantní fúzní proteiny, složené z predikovaných antigenních epitopů, a zkoumat jejich antigenicitu.



Obrázek 7 - Stručné schéma postupu identifikace sekretovaných molekul: A) Laboratorní identifikace: exkrečně sekreční produkty (ESP) izolované z těla motolice *Fascioloides magna* identifikované pomocí hmotnostní spektrometrie, definování proteomu ESP (Cantacessi et al., 2012a) B) Izolace mRNA, sekvenace a tvorba transkriptomu (Cantacessi et al., 2012a) C) *In silico* predikce: predikce sekretovaných molekul z transkriptomu; u proteinů nacházejících se v obou těchto skupinách (A, B) byly predikovány (*in silico*) antigenní sekvence, které byly následně využity pro tvorbu fúzních proteinů

4.1 Bioinformatická analýza

Zdrojem dat pro predikci sekretovaných molekul byl transkriptom *F. magna* obsahující 17 182 transkriptů (Cantacessi *et al.*, 2012a).

4.1.1 *In silico* predikce sekretovaných molekul z transkriptomu *F. magna*

Pro osvojení programování pomocí příkazové řádky byly nejprve vyzkoušeny různé bioinformatické nástroje, které ale pro další postup práce nebyly využity. Nejprve tedy byly využity samostatné nástroje založené na predikci signální sekvence (SignalP 4.0) (Petersen *et al.*, 2011) a predikci transmembránových domén (HMMTOP) (Tusnády and Simon, 2001).

Pro predikci sekretovaných molekul byl použit volně dostupný webový program PECAS (Prokaryotic and Eukaryotic Classical Analysis of Secretome) sdružující funkce několika nástrojů. (SignalP, TMHMM, TargetP a Wolf Psort) viz kapitola 3.3.2. (Cortazar *et al.*, 2015). Schéma pro nastavení tohoto nástroje shrnuje tab. 3.

- SignalP predikce signální sekvence
- TMHMM predikce transmembránových domén
- WolfPsort predikce subcelulární lokalizace založená na třídění signálů, složení aminokyselin a funkčních motivech
- TargetP predikce subcelulární lokalizace založená na přítomnosti N-terminální sekvence (lokalizace – mitochondrie, chloroplast, signální peptid)

Tabulka 3 – Schéma pro nastavení bioinformatického nástroje PECAS (Cortazar et al., 2015)

Schéma predikce u eukaryotických organismů	
SignalP cut-off	0,8
TargetP cut-off	0,8
Maximální počet transmembránových domén	1
Volitelná analýza	
WoLF PSORT cut-off score	14
BLASTp cut-off e-value	1e ⁻⁰⁵

4.1.2 Anotace sekretomu

Sekretované molekuly predikované pomocí nástroje PECAS byly anotovány pomocí databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information) a databáze MEROPS-the Peptidase Database (Rawlings *et al.*, 2018) s využitím nástroje BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool). Pro anotaci jednotlivých transkriptů bylo nastaveno e-value cut-off: $< 10^{-5}$.

4.1.3 Srovnání *in silico* sekretomu s reálným proteomem exkrečně-sekrečních produktů

Aby bylo možné ověřit funkci nástroje PECAS, bylo nejprve nutné použít softwarový balík MaxQuant (Cox and Mann, 2008). Ten má několik funkcí, v naší analýze byl využit pro anotaci hrubých dat z hmotnostního spektrometru s transkriptomem *F. magna*. Jednotlivé parametry pro nastavení MaxQuantu se shodovaly s článkem (Cantacessi *et al.*, 2012a). Anotací byl identifikován proteom ESP (Cantacessi *et al.*, 2012a), který byl využit jako databáze, v níž byly vyhledávány, pomocí BLASTp e-value cut-off: $< 10^{-5}$, sekretované molekuly identifikované *in silico* pomocí PECAS. Transkripty nacházející se jak v *in silico* sekretomu, tak v souboru dat vygenerovaných z MaxQuant (ESP proteom), byly anotovány pomocí databáze NCBI.

4.1.4 Stanovení míry exprese transkriptů v transkriptomu

Doplňující analýzou bylo stanovení abundance jednotlivých transkriptů v transkriptomu. K tomu byl využit nástroj RSEM (RNA-Seq by Expectation Maximization), sloužící ke kvantifikaci krátkých úseků mRNA (Li and Dewey, 2011). V rámci této analýzy byla použita data ze sekvenačního přístroje Illumina-GenBank Sequence Read Archive accession number SRA052828 (Cantacessi *et al.*, 2012a), která byla mapována na transkriptom *F. magna*.

4.1.5 Identifikace antigenní sekvence u sekretovaných molekul

U molekul nacházejících se v *in silico* sekretomu a zároveň v proteomu ESP byly vyhledány antigenní epitopy. K identifikaci byl využit program LBTOPE predikující antigenní oblasti stimulující protilátkovou odpověď (Singh, Ansari and Raghava, 2013) a program BcePred, jehož predikce je založena na základních fyzikálních vlastnostech molekul (hydrofilita, polarita, ohebnost řetězce atd.) Funkce těchto programů byla nejprve ověřena vyhledáním antigenní sekvence u katepsinu L (*F. magna*), u něhož je antigenní úsek známý a experimentálně ověřený (Beránková, 2011). Pomocí programu BcePred nebyla antigenní sekvence určena vůbec. Pomocí programu LBTOPE byla určena pravděpodobnost, že tento úsek bude antigenní, vyšší než 60 %. Dále byl tedy využíván pouze tento program. LBTOPE obsahuje několik datových souborů z imunitní peptidové databáze (IEDB) (Singh et al., 2013; Vita et al., 2015), na nichž byly vyvinuty různé modely pro rozlišování antigenních epitopů.

Pro predikci antigenních epitopů byl použit datový soubor Lbtope_Confirm obsahující epitopy z databáze IEDB (Immune Epitope Database and Analysis Resource) (Vita et al., 2015). Vstupním souborem pro tuto analýzu byl *in silico* sekretom *F. magna* (AMK sekvence). Před samotnou analýzou bylo nastaveno skóre 60 tj. pravděpodobnost antigenicity daného proteinu.

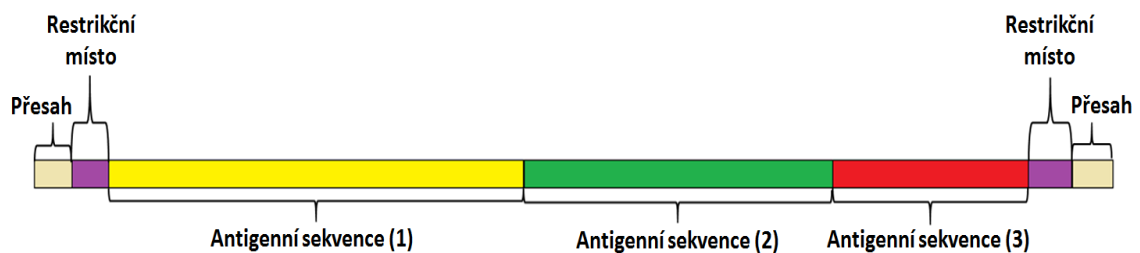
Epitopy, sekretovaných proteinů, s nejvyšším antigenním skóre byly dále tříděny a využity k tvorbě fúzních proteinů. S využitím dostupné literatury byla zjišťována antigenicita těchto proteinů, na základě tohoto zjištění bylo posouzeno, jestli by mohly být využity při diagnostice fasciolidních motolic, či jiných příbuzných druhů. Antigenní epitopy vybraných proteinů byly rozděleny do tří skupin, každá skupina odpovídala jednomu fúznímu proteinu.

- 1) Antigenní epitopy známých antigenních proteinů, tzn. proteinů, u nichž byla v jednotlivých publikacích již dříve potvrzena jejich antigenicita
- 2) Antigenní epitopy známých antigenních proteinů, u nichž byla zjištěna homologie s proteiny motolice *Fasciola hepatica* (BLASTp: e-value cut-off: $< 10^{-5}$).
- 3) Antigenní epitopy neznámých proteinů, které byly predikovány pomocí PECAS jako sekretované, ale nepodařilo se je dále anotovat pomocí veřejně dostupných databází, zároveň byly vysoce exprimované

4.2 Laboratorní analýza

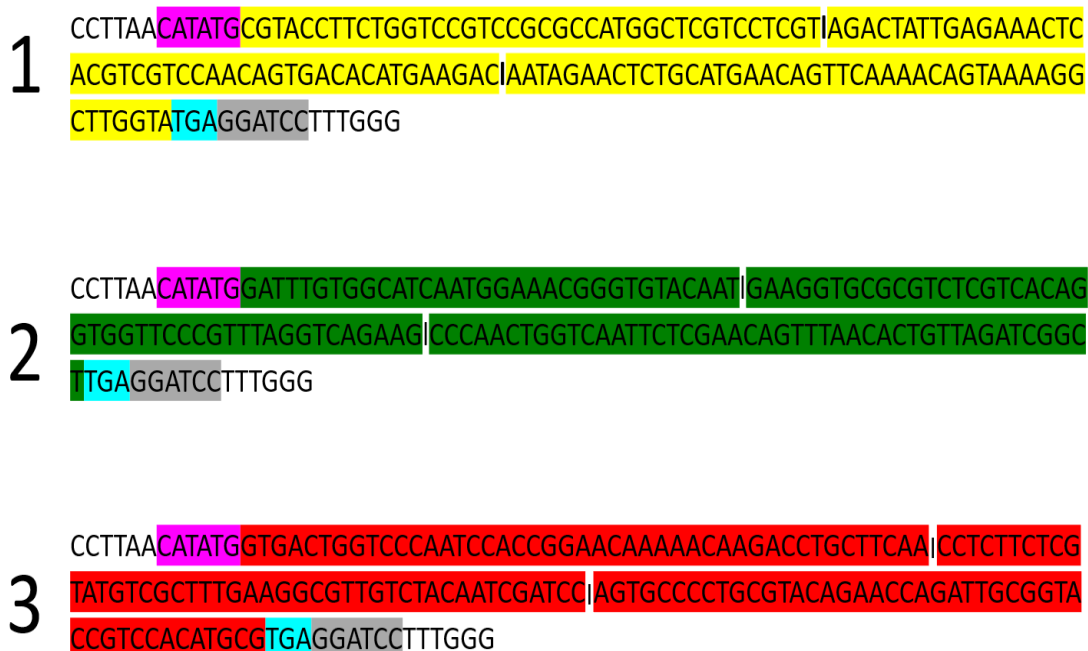
4.2.1 Konstrukce a amplifikace templátové DNA fúzních proteinů

Konstrukce templátu zahrnovala dvě fáze. První fází byla fúzní PCR, pomocí které došlo k fúzi templátu (obr. 8). Další fází byla klasická PCR, pomocí které byl hotový templát amplifikován. Na závěr byla provedena gelová elektroforéza, při níž byl daný produkt vizualizován.



Obrázek 8 - Templát pro konstrukci fúzního proteinu: obsahuje tři antigenní sekvence, specifická místa pro štěpení restrikčními endonukleázami a přesah chránící daný úsek proti degradaci

Každá skupina vybraných antigenních epitopů viz kapitola 4.1.5, dala vznik jednomu templátu využitého pro konstrukci fúzního proteinu. Celé sekvence všech třech templátů jsou znázorněny na obr. 9.



Obrázek 9 - Templáty pro fúzní proteiny: jednotlivá čísla odpovídají skupinám antigenních proteinů (viz kapitola 4.1.5), bílou barvou jsou neoznačené přesahy, fialovou a šedou barvou jsou označeny sekvence pro štěpení restriční endonukleázou (NdeI, BamHI), ostatní barvy znázorňují jednotlivé antigenní sekvence viz obr. 8 (jednotlivé sekvence jsou pro lepší přehled odděleny vertikálním dělítkem)

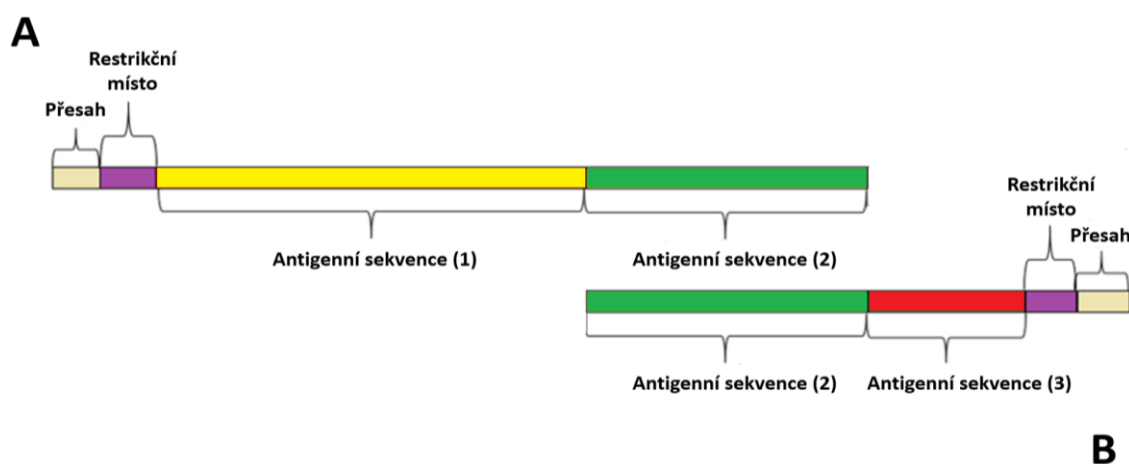
1) Fúzní PCR

Pro fúzní PCR byly nejprve navrženy primery (SigmaAldrich) – tab. 4. Každý z nich obsahoval přesah, specifické restriční místo pro endonukleázy BamHI, NdeI (NEW ENGLAND BioLabs®) a příslušné antigenní sekvence. Princip této metody spočívá v částečném překrytí úseků navržených primerů (tab. 4), které jsou vzájemně komplementární.

Tabulka 4 - Navržené primery pro fúzní PCR specifické pro každý templát fúzního protein viz obr. 9

Název primeru	Sekvence
Fúzní protein 1-Fw	5'-CTTAACATATGCGTACCTTCTGGTCCGTCCGCGCCATGGCTC GTCCTCGTAGACTATTGAGAACTCACGTCGTCCAACAGTG-3'
Fúzní protein 1-Rev	5'-CCCAAAGGATCCTCATACCAAGCCTTTTACTGTTTTG AACTGTTTCATGCAGAGTTCTATTGTCTTCATGTGTCACACTGTTGG ACGACGTGAGTTTCT-3'
Fúzní protein 2-Fw	5'-CCTTAACATATGGATTTGTGGCATCAATGGAAACGG GTGTACAATGAAGGTGCGCGTCTCGTCACAGGTGGTTCCCGT-3'
Fúzní protein 2-Rev	5'-CCCAAAGGATCCTCAAGCCGATCTAACAGTGTTAAA CTGTTTCGAGAATTGACCAGTTGGGCTTCTGACCTAAACGGGAA C CACCTGTGACGA GACG-3'
Fúzní protein 3-Fw	5'-CCTTAACATATGGTGACTGGTCCCAATCCACCGGA ACAAAAACAAGACCTGCTTCAACCTCTTCTCGTATGT CGCTTTGAAGGCGTTGT-3'
Fúzní protein 3-Rev	5'-CCCAAAGGATCCTCACGCATGTGGACGGTACCGCA ATCTGGTTCTGTACGCAGGGGCACTGGATCGATTG TAGACAACGCCTTCAAAGCGA CATAACGAG-3'

Pomocí fúzní PCR by mělo dojít ke spojení těchto úseků a tvorbě templátu. Tento postup je naznačen na obr. 10.



Obrázek 10 – Konstrukce templátu fúzního proteinu: A) Forward primer pro fúzní PCR tvořený dvěma antigenními sekvencemi (1,2) B) Reverse primer pro fúzní PCR tvořený úsekem, který je komplementární pro část (cca 25 bp) antigenní sekvence (2) a dále obsahuje zbývající antigenní sekvenci (3)

Celkový objem reakční směsi pro fúzní PCR byl 25 µl. Místo standardní Tag-polymerázy byla použita polymeráza Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEW ENGLAND BioLabs®). Množství jednotlivých složek reakční směsi bylo připraveno dle protokolu, který je s touto polymerázou dodáván (tab. 5A). Program thermocycleru (BioRad) je znázorněn v tab. 5B.

Tabulka 5 - Reakční směs (A) a program thermocycleru (B) pro fúzní PCR

A	Reagencie	Množství v µl	B	Program	Teplota (°C)	Čas (s)
	5x Fúzní HF pufr	5		počáteční denaturace	98°	30
	10 mM dNTPs	0,5		4 cykly	98	10
	100 uM primer forward	1,25			57	30
	100 uM primer reverse	1,25			72	30
	Fúzní DNA polymeráza	0,25		terminální elongace	72	600
	DMSO	0,75		chlazení	4	∞
	Destilovaná H ₂ O	doplnit do 25				

2) Klasická PCR

Po provedení fúzní PCR bylo přistoupeno ke klasické PCR reakci. Do směsi, ve které byl připraven templát (výsledek fúzní PCR), byly přidány krátké primery (tab. 6) pro amplifikaci celého úseku. Tyto primery byly naředěny standardně – 10 µM. Navíc bylo přidáno 0,4 µl fúzní polymerázy (NEW ENGLAND BioLabs®). Program thermocycleru (Bio-Rad) pro klasickou PCR je znázorněn v tab. 7.

Tabulka 6 – Primery pro klasickou PCR reakci s využitím standardních krátkých oligonukleotidů o velikosti cca 22 bp), barevné označení opět koresponduje s obr. 9

Název primeru	Sekvence
Fúzní protein 1-Fw	5'-CCTTAACATATGCGTACCTTCT-3'
Fúzní protein 1-Rev	5'-CCCAAAGGATCCTCATACCAA-3'
Fúzní protein 2-Fw	5'-CCTTAACATATGGATTTGTGGC-3'
Fúzní protein 2-Rev	5'-CCCAAAGGATCCTCAAGCCGA-3'
Fúzní protein 3-Fw	5'-CCTTAACATATGGTGACTGGTC-3'
Fúzní protein 3-Rev	5'-CCCAAAGGATCCTCACGCATG-3'

Tabulka 7 – Program thermocycleru pro klasickou PCR s použitím krátkých oligonukleotidů k amplifikaci požadovaného templátu

Program	Teplota (°C)	Čas (s)
počáteční denaturace	98	30
38 cyklů	98	10
	60	30
	72	30
terminální elongace	72	600
chlazení	4	∞

3) Gelová elektroforéza a purifikace

Nejprve byl připraven 2 % agarosový gel, barvený SYBR Green I (Invitrogen), elektroforéza probíhala při napětí 100 V. Pro odečtení velikosti ampliconů byl použit velikostní standard GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific). Úseky o požadované velikosti (cca 150 bp) byly vyříznuty a přečištěny dle protokolu (ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit). Koncentrace purifikované DNA byla změřena na přístroji NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

4.2.2 Ligace insertu do klonovacího vektoru

Pro ligaci PCR produktu byly využity 2 klonovací Kity CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) byl použit pro ligaci templátové DNA fúzních proteinů 2 a 3 (viz obr. 9) a pro ligaci templátové DNA fúzního proteinu 1 (viz obr. 9) byl využit pGEM®-T Vector System (Promega).

1) CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific)

Dle velikosti sekvence bylo vypočteno množství DNA potřebné do ligační reakce, cca 15 ng. Dále byla připravena reakční směs o celkovém objemu 20 µl dle přiloženého protokolu (tab. 8). Směs byla vortexována 5 s a inkubována 5 min při pokojové teplotě.

Tabulka 8 - Směs pro ligační reakci pomocí CloneJET PCR Cloning Kit

Reagencie	Objem (µl)
2x Reakční pufr	10
PCR produkt	1
pJET1.2/blunt Cloning Vector	1
T4 DNA ligáza	1,7
Destilovaná voda	doplnit do 20

2) pGEM®-T Vector Systems (Promega)

Aby tento klonovací systém fungoval, bylo nejprve zapotřebí adenylovat 3' konec PCR produktu pomocí Taq-polymerázy (Thermo Fisher Scientific) tak, aby byl s příslušným vektorem komplementární. Reakční směs pro tuto reakci je znázorněna v tab. 9.

Tabulka 9 – Reakční směs pro adenylaci 3' konce PCR produktu

Reagencie	Objem (µl)
Taq – reakční pufr	1
PCR produkt	5
Taq polymeráza	1
2 mM dATP	1

Ligační reakce byla provedena dle protokolu u příslušného kitu. Množství složek reakční směsi je vyznačeno v tab. 10.

Tabulka 10 - Reakční směs pro ligaci insertu pomocí kitu pGEM®-T Vector Systems

Reagencie	Objem (μl)
2x Rapid ligační pufr, T4 DNA ligáza	5
PCR produkt	2
pGEM – T Cloning Vector	1
T4 DNA ligáza	1
Destilovaná voda	doplnit do 10

4.2.3 Klonování – transformace bakterií a ověření přítomnosti insertu v klonovacím vektoru

Zmražené buňky *Escherichia coli* TOP10 (Thermo Fisher Scientific) při teplotě -80 °C byly umístěny na led. Do zkumavek bylo přidáno 5 μl ligační směsi (tab. 10) a poté 25 μl buněk *E. coli*. Roztok byl opatrně promíchán, aby nedošlo k poškození buněk, a inkubován 30 min na ledu. Po inkubaci byl proveden teplotní šok na 42 °C po dobu 45 s. Poté byl vzorek opět umístěn na led. K roztoku bylo přidáno 250 μl S. O. C média (Sigma Aldrich) a takto připravený roztok byl inkubován v LB médiu (Sigma Aldrich) při 37 °C a 225 rpm po dobu 1,5 h.

Na LB plotny s ampicilinem o koncentraci 100 mg/l ml bylo přidáno 50 μl *E. coli* namnožených v LB médiu (Sigma Aldrich) a při 37 °C byly tyto plotny inkubovány přes noc. Další den byly na plotnách označeny kolonie, které byly špičkou pipety naočkovány na nové plotny z LB médiem (inkubace při 37 °C). Aby bylo možné potvrdit, zda se ligace insertu do vektoru zdařila, byly jednotlivé špičky po naočkování promyty v 8 μl H₂O pro následné rozrušení bakteriálních buněk a uvolnění plazmidové DNA. Zkumavky obsahující roztok bakterií v 8 μl H₂O byly vloženy do thermocycleru (Bio-Rad). Program thermocycleru je znázorněn v tab. 11.

Tabulka 11 - - Program cycleru pro rozrušení bakteriálních buněk *E. coli*

Program	Teplota (°C)	Čas (s)
počáteční denaturace	96	300
1 cyklus	50	110
	96	110
	45	60
	99	60
terminální elongace	40	60
chlazení	4	120

Po rozrušení buněk byla provedena klasická PCR reakce. Do stejné zkumavky byla přidána směs, tak aby celkové množství roztoku ve zkumavce bylo 25 µl. Složení roztoku je vyznačeno v tab. 12. Program thermocycleru (Bio-Rad) pro klasickou PCR je znázorněn v tab. 13.

Tabulka 12 - Reakční směs pro PCR navazující na rozrušení bakteriálních buněk *E. coli*

Reagencie	Množství (µl)
PPP Master Mix (Top-Bio)	12,5
pJET1.2 Fw Sequencing Primer, 10 µM	1
pJET1.2 Rev Sequencing Primer, 10 µM	1
DNA	8 (již ve zkumavce)
H ₂ O	doplnit do 25

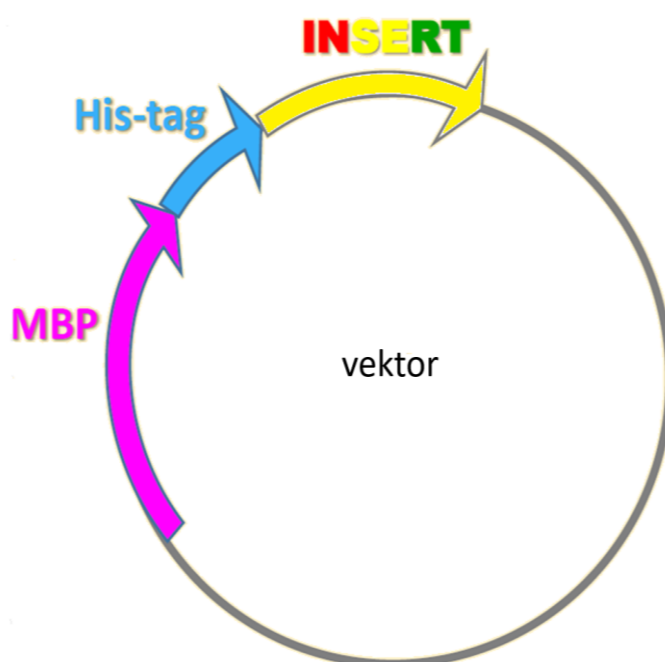
Tabulka 13 - Program thermocycleru pro PCR navazující na rozrušení bakteriálních buněk *E. coli*

Program	Teplota (°C)	Čas (s)
počáteční denaturace	94	120
30 cyklů	94	60
	60	60
	72	60
terminální elongace	72	600
chlazení	4	∞

Výsledné PCR produkty byly naneseny na 1,5 % agarosový gel. Pro vizualizaci bylo použito barvivo SYBR Green I (Invitrogen) a jako velikostní standard byl použit GeneRuler Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific). Úseky o požadované velikosti byly vyříznuty, přečištěny (ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit) a odeslány na sekvenaci. Bakterie, u kterých se podařila ligace příslušného insertu byly pomnoženy v LB médiu (Sigma Aldrich) a zamraženy v 15 % glycerolu při – 80 °C.

4.2.4 Ligace insertu do expresního vektoru a exprese v *E. coli*

Ing. RNDr. Martin Marek Ph.D., Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity poskytl upravený expresní plazmid obr. 11, který je derivátem expresního vektoru pET-15b (Addgene). Poskytnuta nám byla pouze jednoduchá mapa tohoto vektoru. K dispozici byl plazmid transformovaný v bakteriích *E. coli* BL21. Pro další použití ho bylo nejprve nutné přečistit pomocí kitu Hybrid-Q plasmid (GeneAll) dle přiloženého protokolu.



Obrázek 11 – Schématická mapa expresního vektoru: expresní vektor navržený pro expresi fúzních proteinů odvozený od vektoru pET-15b (Addgene); vektor obsahuje MBP (maltose-binding protein), His-tag (histidinová kotva) a požadovaný insert

4.2.5 In-fusion cloning

Jelikož se ligace, insertu do expresního vektoru, s využitím restričních endonukleáz opakovaně nedařila, byl vyzkoušen In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech), který umožňuje ligaci insertu do expresního vektoru v krátkém čase.

Tato metoda se skládá z několika kroků. Nejprve je nutné linearizovat expresní vektor tím, že je rozštěpen v jednom místě restriční endonukleázou. V tomto případě byl expresní vektor štěpen pomocí restriční endonuklázy BamHI (NEW ENGLAND BioLabs®). Dále bylo nutné navrhnout primery obsahující jak přesahy (15 bp) komplementární ke specifickým místům na expresním vektoru, tak úsek specifický pro daný fúzní protein. Navržené primery jsou znázorněny v tab. 14.

Tabulka 14 – Primery navržené pro In-fusion Cloning technologii (InFusion 1-3 jsou specifické pro fúzní proteiny 1-3, viz obr. 9)

Název primeru	Sekvence primeru
InFusion-1-Fw	5'-TAAGCAATTGGGATCCCGTACCTTCTGGTCCGTCCG-3'
InFusion-1-Rev	5'-TACCCTATTAGGATCCTACCAAGCCTTTTACTGTTTTG AACTGTTCAT-3'
InFusion-2-Fw	5'-TAAGCAATTGGGATCCGATTTGTGGCATCAATGG AAACGGG-3'
InFusion-2-Rev	5'-TACCCTATTAGGATCCAGCCGATCTAACAGTGTTAA ACTGTTCG-3'
InFusion-3-Fw	5'-TAAGCAATTGGGATCCGTGACTGGTCCCAATCC ACC-3'
InFusion-3-Rev	5'-TACCCTATTAGGATCCCGCATGTGGACGGTACCG-3'

Pomocí těchto primerů byl insert amplifikován. Tím vzniknul námi požadovaný produkt se specifickým přesahem. Vytvořený PCR produkt byl ověřen gelovou elektroforézou. Úseky o požadované velikosti (cca 150 kDa) byly vyříznuty a přečištěny dle protokolu (Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit). Koncentrace purifikované DNA byla změřena na přístroji NanoDrop (Thermo Fisher Scientific).

Přečištěné produkty mohly být použity do ligační reakce. Reakční směs je znázorněna v tab. 15. Insert by měl být s expresním vektorem v poměru 2:1. Tato reakční

směs byla inkubována 15 min při 50 °C a ihned transformována do bakterií *E. coli* TOP 10 (Thermo Fisher Scientific).

Tabulka 15 – Reakční směs pro ligaci insertu do expresního vektoru

Reagencie	Množství
Přečištěný PCR produkt	10–200 ng
Linearizovaný expresní vektor	50–200 ng
5 x In-fusion HD Enzyme Premix	1 ul
Deionizovaná voda	Do 10 ul

Z narostlých bakteriálních kolonií byl izolován plazmid, který byl následně zaklonován do expresních buněk *E. coli* BL21. Přítomnost insertu byla opět ověřena rozrušením bakteriálních buněk viz kapitola 4.2.3.

4.2.6 Exprese *E. coli* BL21

Z narostlých kolonií *E. coli* BL21, ve kterých byla potvrzena přítomnost insertu, byla odebrána špičkou vždy jedna kolonie, která byla následně pomnožena v LB médiu s ampicilinem 100 mg/1 ml (Sigma Aldrich), při 37 °C a 220 rpm. V tomto médiu byla sledována optická denzita pomocí přístroje Biochrom WPA S800+ Visible Spectrophotometer (Biochrom). Při dosažení optické denzity kolem 0,4, tj. exponenciální fáze, při které dochází k největšímu růstu bakteriálních buněk, byla exprese indukována přidáním IPTG tak, aby výsledná koncentrace roztoku byla 0,5 mM. Přidání IPTG je nezbytné proto, aby bakteriální buňky začaly produkovat požadovaný protein. Tento roztok s přidáním IPTG byl inkubován přes noc při 25 °C a 220 rpm.

Médium s namnoženými bakteriemi bylo centrifugováno 15 min při 3000 g. Supernatant byl odstraněn a pelet smíchán s lyzačním pufrem (10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0). Pelet s lyzačním pufrem byly poté na 10 min zamraženy při teplotě -80 °C a pak sonikovány za nepřetržitého chlazení ledem po dobu 1 min (Vibra-Cell™ 72405) pro rozrušení bakteriálních buněk. Nakonec byl tento roztok centrifugován při teplotě 4 °C po dobu 45 min, při 11 000 g. Centrifugací byl oddělen bakteriální pelet od supernatantu.

4.2.7 Ověření přítomnosti exprimovaného proteinu a jeho purifikace

Aby bylo možné ověřit, zda se exprimovaný protein nachází v supernatantu nebo v peletu, bylo nutné nejprve část vzorků odebrat a separovat je pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy.

Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Pro separaci byly použity 10 % polyakrylamidové gely o tloušťce 1 mm. Vzorky supernatantu a peletu byly nejprve smíchány s redukujícím vzorkovým pufrém (0,6 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8; 5 ml 50 % glycerolu; 2 ml 10 % SDS; 7,7 mg DDT; 1 ml 1 % Bromfenylové modři; 1,4 ml H₂O) a společně s proteinovými standardy Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Proteins Standards (BioRad) byly nanášeny na gel. Dělení nanesených vzorků probíhalo vertikálně v elektroforetické cele MINI-Protean® 3 cell (BIO-RAD) při konstantním napětí 150 V. Po elektroforéze byly gely barveny Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye (Thermo Fisher Scientific) po dobu 10 min a následně odbarvovány odbarvovacím roztokem (7% kyselina octová a 5% metanol v dH₂O). Proteinové profily v gelech byly na závěr foceny pomocí skeneru GS-800 Calibrated Densitometer (BIO-RAD).

Purifikace rekombinantního proteinu – afinitní chromatografie

Po ověření přítomnosti proteinu v supernatantu bylo možné přistoupit k purifikaci. Rekombinantní proteiny obsahovaly speciální afinitní značku – His-tag se schopností vázat se na ionty kovů (např. Ni²⁺). K supernatantu byl nejprve přidán 1 ml niklových kuliček Ni-NTA-Agarose (Qiagen). Roztok byl inkubován při 4 °C po dobu 30 min za občasného promíchání. Směs byla poté nanášena do chromatografické kolony Poly-Prep®Chromatography Column (Bio-Rad), která byla předem ekvilibrována lyzačním pufrém (10 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 8.0). Po nanesení vzorku byla membrána dvakrát promyta promývacím (lyzačním) pufrém. Vzorek byl následně eluován přidáním 500 µl roztoku (200 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 200 mM Imidazol). Celkem byla eluce provedena šestkrát, jednotlivé frakce byly postupně odebrány.

Z každé eluce (včetně promývacích kroků) bylo odebráno 24 µl, které byly smíchány s redukujícím vzorkovým pufrém. Tyto vzorky byly poté separovány na polyakrylamidovém elektroforetickém gelu. Specifické reakce v požadované oblasti byly

vyříznuty a poslány k analýze na hmotnostní spektrometrii do Laboratoře hmotnostní spektrometrie PřF UK.

Zbytek vzorků byl zkoncentrován pomocí filtračních kolonek Amicon® Ultra-0,5 Centrifugal Filter Devices (Millipore) dle protokolu. Koncentrace jednotlivých frakcí byla měřena na fluorometru Infinite M200 (Tecan).

U purifikovaných rekombinantních fúzních proteinů byla následně ověřována jejich antigenicita pomocí imunologické metody ELISA.

4.2.8 ELISA

Pro metodu ELISA byly jako antigeny využity tři rekombinantní proteiny. Jako kontrolní antigen sloužily ESP motolic *F. magna* a *F. hepatica*.

Antigen o koncentraci 1 µg/jamka naředěný v uhličitanovém pufru (0,159 g Na₂CO₃, 0,293 g NaHCO₃ do 100 ml destilované vody, pH = 9,6), byl nanesen do jamek mikrotitrační destičky 100 µl/jamka. Destička byla inkubována ve vlhké komůrce přes noc při 4 °C. Druhý den byly jamky destičky nejprve promyty 3x po 1 min 0,1 M fosfátovým pufrům (PBS) s přídavkem 0,05% Tween (Bio-Rad). Následně byla destička blokována 1% BSA s PBS-T po 1 hodinu. Zbytky blokovacího pufru byly z destičky odstraněny (prudké vystříknutí) a do každé jamky byla nanesena primární protilátka ředěna v poměru 1:100 a 1:200 dle tab. 16 (100 µl/jamka), destička byla inkubována 3 hodiny a následně opět 3x promyta v PBS-T. Dále byla nanesena sekundární protilátka ředěna v poměru 1:1000, destička byla inkubována 1 hodinu. Přidání protilátek a jejich ředění je shrnuto v tab. 16. Po inkubaci byla destička 3x promyta v PBS-T a pro vizualizaci byl do všech jamek přidán TMB (tetramethylbenzidin) substrát (Thermo Fisher Scientific), po 100 µl/jamka. Přidáním TMB substrátu se v jamkách vyvíjelo modré zbarvení. Reakce byla po 1-2 min zastavena přidáním 1M HCl, 50 µl do každé jamky, což se projevilo žlutým zbarvením. V jednotlivých jamkách byla nakonec odečítána absorbance při 450 nm, na přístroji Infinite M200 (Tecan).

Tabulka 16 - Schéma ELISA experimentu: primární protilátka (sloupec 1-8), sekundární protilátka (sloupec 9-10), negativní kontrola tzn. pufr (sloupec 11-12); jednotlivé vzorky nanášeny v doubletech; schéma použito pro každý antigen (rekombinantní proteiny 1-3 a ESP)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Jelen pozitivní Fm 1:100		Jelen negativní Fm 1:100		Jelen pozitivní Fm 1:200		Jelen negativní Fm 1:200		Anti-Deer IgG 1:1000		PUFR	
B	Býk pozitivní Fh 1:100		Býk negativní Fh 1:100		Býk pozitivní Fh 1:200		Býk negativní Fh 1:200		Anti-Bovine IgG 1:1000		PUFR	
C	Beran pozitivní Fh 1:100		Beran negativní Fh 1:100		Beran pozitivní Fh 1:200		Beran negativní Fh 1:200		Anti-Sheep IgG 1:1000		PUFR	
D	Potkan pozitivní Fm 1:100		Potkan negativní Fm 1:100		Potkan pozitivní Fm 1:200		Potkan negativní Fm 1:200		Anti-Rat IgG 1:1000		PUFR	
E	Koza pozitivní Fh 1:100		Koza negativní Fh 1:100		Koza pozitivní Fh 1:200		Koza negativní Fh 1:200		Anti-Goat IgG 1:1000		PUFR	
F	Koza pozitivní Fm 1:100		Koza negativní Fm 1:100		Koza pozitivní Fm 1:200		Koza negativní Fm 1:200		Anti-Goat IgG 1:1000		PUFR	

5 VÝSLEDKY

5.1 Bioinformatická analýza

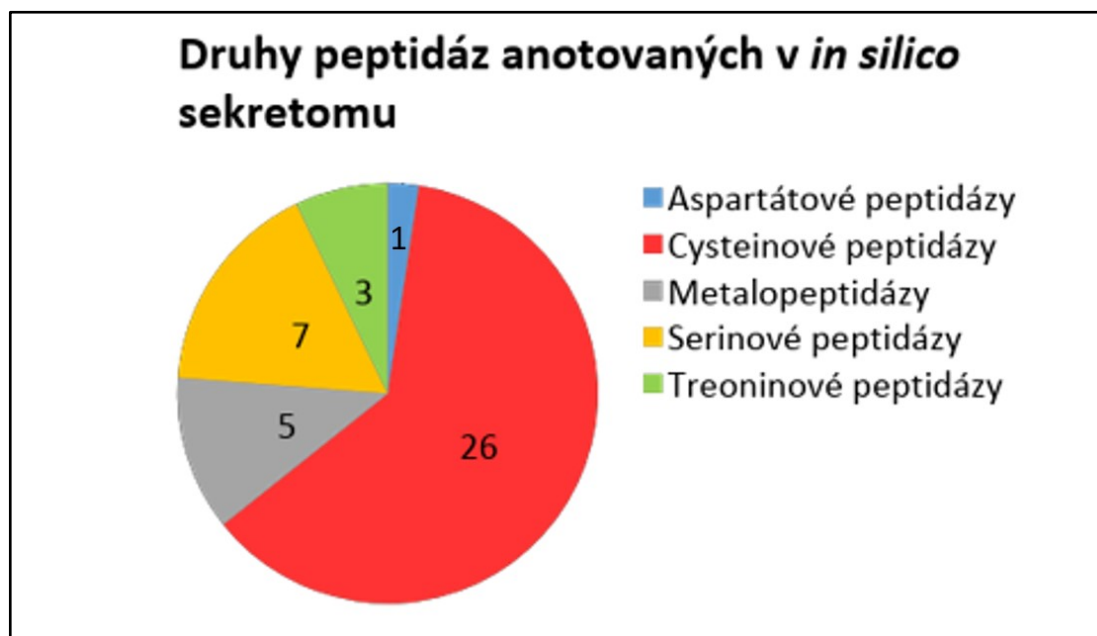
5.1.1 *In silico* predikce sekretovaných molekul z transkriptomu dospělců *F. magna*

S využitím webového nástroje PECAS bylo predikováno 700 transkriptů (predikovaných sekretovaných proteinů) tzv. *in silico* sekretom viz příloha 1.

5.1.2 Anotace sekretomu

Pomocí databáze NCBI bylo anotováno 296 z celkového počtu 700 predikovaných transkriptů. 276 transkriptů bylo přiřazeno zástupcům třídy Trematoda a 2 transkripty do třídy Cestoda. 404 transkriptů se anotovat nepodařilo. Anotované a neanotované predikované transkripty jsou shrnuty v příloze 2.

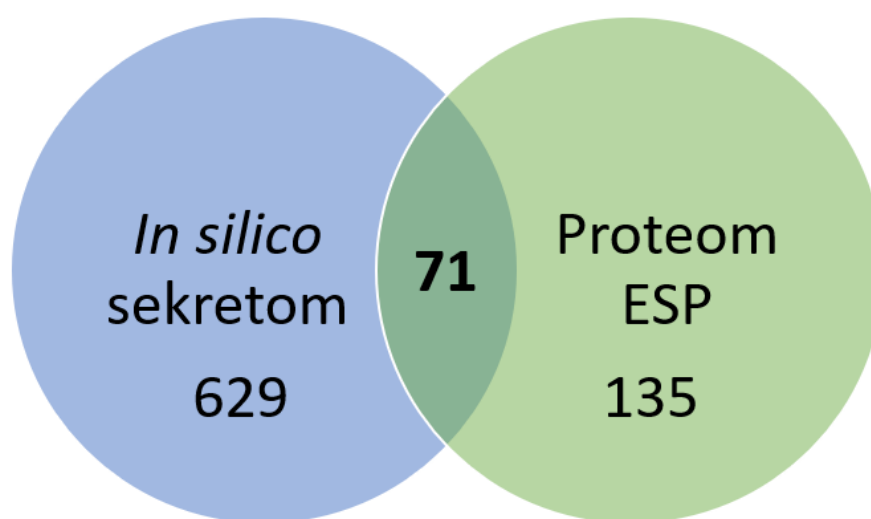
Pomocí databáze MEROPS bylo anotováno 61 transkriptů – 42 peptidáz a 19 inhibitorů (příloha 3). Graf 1 znázorňuje zastoupení jednotlivých druhů peptidáz.



Graf 1 – Druhy peptidáz anotovaných v *in silico* sekretomu pomocí databáze MEROPS

5.1.3 Srovnání *in silico* sekretomu s proteomem exkrečně-sekrečních produktů

Pomocí programu MaxQuant byla anotována data získaná z hmotnostního spektrometru, tzn. ES produkty *F. magna* (Cantacessi *et al.*, 2012a) s transkriptomem *F. magna*. Výsledek byl srovnán s predikovaným *in silico* sekretomem. Celkem bylo pomocí programu MaxQuant identifikováno 206 transkriptů, transkripty a jejich anotace je znázorněna v příloze 4. V *in silico* sekretomu bylo nalezeno 71 transkriptů. Průnik dvou množin (*in silico* sekretomu a proteomu ESP znázorňuje obr. 12).



Obrázek 12 – Vennův diagram vyjadřující průnik dvou množin: *in silico* sekretom predikovaný pomocí bioinformatických nástrojů a proteom ESP, který byl identifikován laboratorně pomocí hmotnostní spektrometrie; výsledkem je 71 proteinů společných pro obě množiny

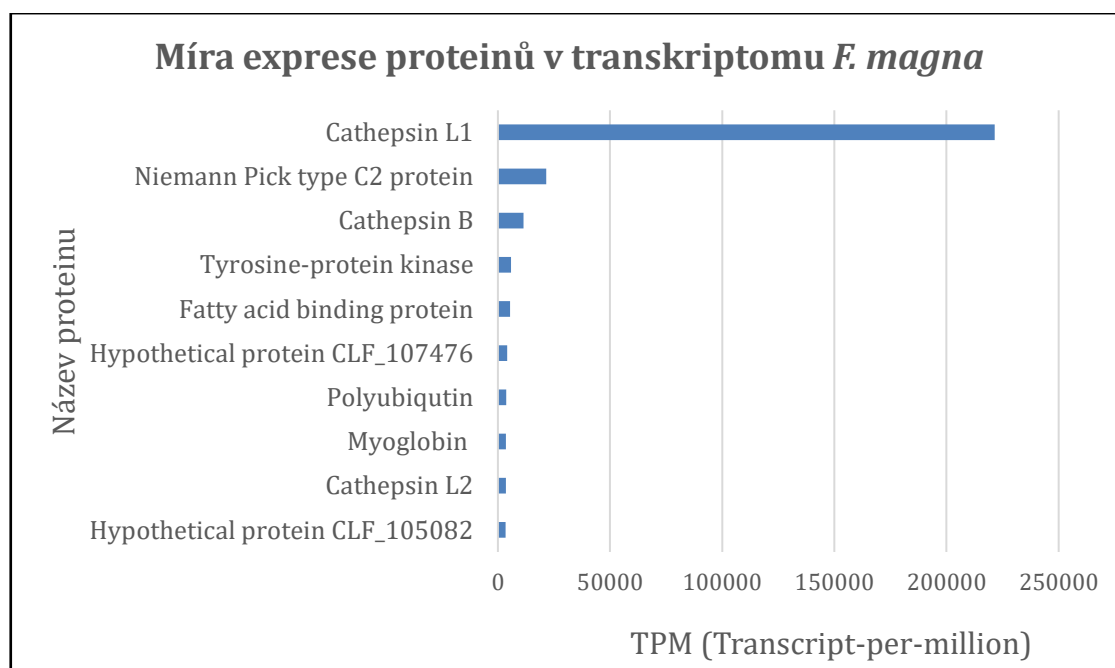
71 predikovaných transkriptů bylo následně anotováno s databází NCBI pomocí BLASTp a ke každému transkriptu byl přiřazen určitý protein. Celkem bylo identifikováno 31 proteinů tab. 17, zastoupení jednotlivých transkriptů shrnuje příloha 5.

Tabulka 17 – Proteiny identifikované porovnáním *in silico* sekretomu *Fascioloides magna* a reálného proteomu ESP (Cantacessi et al. 2012a)

Identifikované proteiny	Druh organismu s nejvyšší homologií
cathepsin L1	<i>Fascioloides magna</i>
cathepsin L-like proteinase	<i>Fasciola hepatica</i>
hypothetical protein D915_06675	<i>F. hepatica</i>
ribosomal L40e family protein	<i>F. hepatica</i>
CD59-like protein	<i>F. hepatica</i>
cathepsin B4	<i>Fasciola gigantica</i>
legumain-1	<i>F. gigantica</i>
cathepsin B	<i>F. gigantica</i>
legumain-2	<i>F. gigantica</i>
Stefin-1	<i>F. gigantica</i>
cathepsin L2	<i>F. gigantica</i>
lysosomal pro-X carboxypeptidase, partial	<i>Clonorchis sinensis</i>
tetraspanin-CD63 receptor	<i>C. sinensis</i>
putative phospholipase B-like 2	<i>C. sinensis</i>
carbonic anhydrase	<i>C. sinensis</i>
sphingomyelin phosphodiesterase	<i>C. sinensis</i>
putative phospholipase B-like 2	<i>C. sinensis</i>
carbonic anhydrase	<i>C. sinensis</i>
cyclophilin A	<i>C. sinensis</i>
p90 ribosomal S6 kinase	<i>C. sinensis</i>
serine/threonine-protein kinase ICK	<i>C. sinensis</i>
SJCHGC00284 protein	<i>Schistosoma japonicum</i>
Niemann-Pick C2 protein	<i>S. japonicum</i>
putative immunoglobulin domain superfamily	<i>S. japonicum</i>
aldehyde dehydrogenase, putative	<i>Schistosoma mansoni</i>
cathepsin B1, partial	<i>Trichobilharzia szidati</i>
tolloid-like protein 1	<i>Acropora digitifera</i>
cubilin	<i>Anolis carolinensis</i>
Ubiquitin	<i>Camponotus floridanus</i>
polyubiquitin, partial	<i>Rhodotorula sp.</i>
sialidase-like isoform X1	<i>Xenopus tropicalis</i>

5.1.4 Stanovení míry exprese transkriptů

Jednotlivé transkripty byly seřazeny, dle jejich míry exprese. V grafu 2 je znázorněno 10 proteinů s nejvyšší expresí. Příloha 6 znázorňuje 50 nejvíce exprimovaných transkriptů.



Graf 2 – Míra exprese sekretovaných proteinů, v transkriptomu *F. magna*, identifikovaná pomocí nástroje RSEM: TPM (transcripts per million) hodnota vyjadřuje míru exprese

5.1.5 Identifikace antigenních epitopů u sekretovaných molekul

Antigenní epitopy vybraných sekretovaných molekul jsou znázorněny v tab. 18. Identifikovány byly antigenní epitopy katepsinu L a B, cyklofilinu, legumainu, aldehyd dehydrogenázy a dále epitopy neznámých proteinů, které byly nakonec využity ke konstrukci fúzních proteinů.

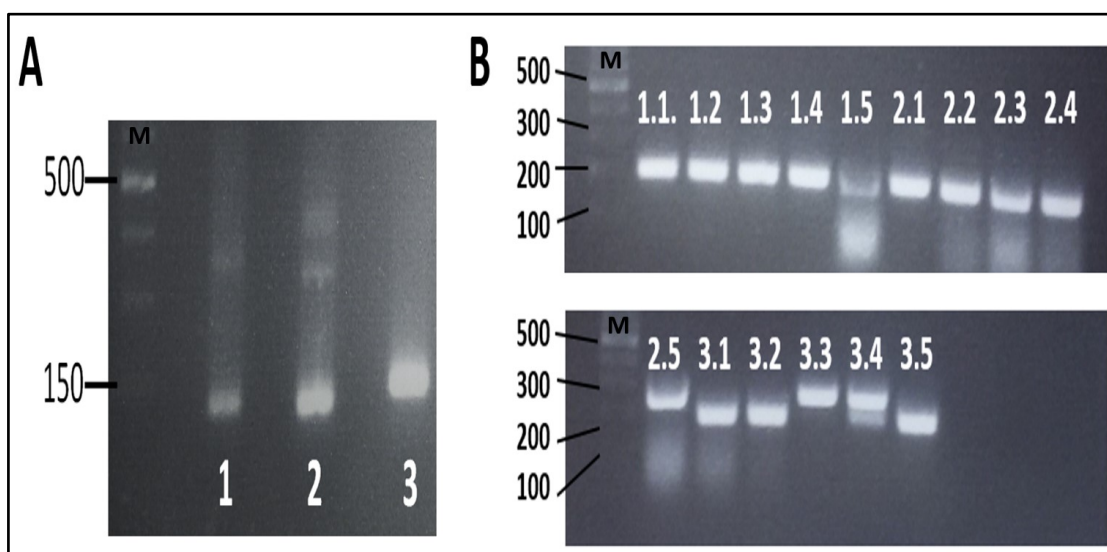
Tabulka 18 – Vybrané sekretované proteiny a jejich antigenní sekvence využité pro tvorbu rekombinantních fúzních proteinů: proteiny jsou rozděleny do skupin: žluté označení (známé antigenní proteiny specifické pro diagnostiku *F. magna*), zelené označení (známé antigenní proteiny s homologií s *F. hepatica*), červené označení (neznámé proteiny identifikované pomocí PECAS, ale neanotované pomocí databází NCBI, KEGG, UniProt)

Název transkriptu	Název proteinu	AMK sekvence	NK sekvence	Článek ve, kterém byla zkoumána antigenicita
>New_Locus_2002_Transcript 1/1	cyclophilin A	RTFWS VRAMA RPR	CGTACCTTCTGGTCCGT CCGCGCCATGGCTCGTC CTCGT	(Wu <i>et al.</i> , 2011)
>New_Locus_403_Transcript 1/1	cathepsin B1	RLLRNS RRPTVT HED	AGACTATTGAGAACTC ACGTCGTCCAACAGTGA CACATGAAGAC	(Noya <i>et al.</i> , 2001)
>New_Locus_85_Transcript 1/1	legumain-2	NRTLH EQFKT VKGLV	AATAGAACTCTGCATGA ACAGTTCAAAACAGTAA AAGGCTTGGTA	(Ju <i>et al.</i> , 2009)
>New_Locus_11_Transcript 3/4	cathepsin L1D	DLWHQ WKRYY N	GATTTGTGGCATCAATG GAAACGGGTGTACAAT	(Mulcahy and Dalton, 2001)
>New_Locus_? Transcription 3/4	aldehyde dehydrogenase	EGARL VTGGS RLGQK	GAAGGTGCGCGTCTCGT CACAGGTGGTTCCCGTT TAGGTCAGAAG	(Crossley <i>et al.</i> , 1986)
>New_Locus_? Transcription 3/4	legumain 1	PNWSIL EQFNT VRSA	CCCAACTGGTCAATTCT CGAACAGTTTAACACTG TTAGATCGGCT	(Ju <i>et al.</i> , 2009)
>New_Locus_348_Transcript 1/1	unknown	VTGPN PPEQK QDLLQ	GTGACTGGTCCCAATCC ACCGGAACAAAAACAA GACCTGCTTCAA	-
>New_Locus_333_Transcript 1/1	unknown	PLLVCR FEGVV YNRS	CCTCTTCTCGTATGTCTG CTTTGAAGGCGTTGTCT ACAATCGATCC	-
>New_Locus_217_Transcript 3/3	unknown	SAPAY RTRLR YRPHA	AGTGCCCCTGCGTACAG AACCAGATTGCGGTACC GTCCACATGCG	-

5.2 Laboratorní analýza

5.2.1 Konstrukce fúzních proteinů a ligace do klonovacího vektoru

Pomocí fúzní a následně klasické PCR se podařilo amplifikovat celé sekvenční templáty fúzních proteinů. Na gelu byly jasně viditelné pozitivní fragmenty v oblasti 130 bp u všech vzorků, což odpovídá velikosti fúzních proteinů. Elektroforetický gel je znázorněn na obr. 13A. Templát (insert) se poté podařilo zaligovat do klonovacího vektoru, což bylo opět ověřeno na gelové elektroforéze obr. 13B.



Obrázek 13 – Gelová elektroforéza: A) amplifikované templáty fúzních proteinů (vzorky 1-3 v oblasti 130 bp) B) ligace templátu fúzních proteinů do klonovacího vektoru pJET1.2/blunt; první číslo značí vždy příslušný templát fúzního proteinu, který by měl být v oblasti 250 bp) a druhé číslo označuje bakteriální kolonii nesoucí daný insert; M (marker), černá čísla označují počet bp

Vzorky 1.1, 2.5, 3.3, 3.4 a 3.5, byly vyříznuty, přečištěny a odeslány na sekvenaci. Celé sekvenční insertu byly identifikovány ve vzorcích 2.5, 3.3 a 3.4, které byly vizualizovány v oblasti 250 bp. U insertu 2 a 3 bylo tedy možné provést ligaci do expresního vektoru. U insertu 1 byla ligace znovu provedena pomocí kitu pGEM®-T Vector System, u něhož byl výsledný produkt v oblasti 400 bp.

5.2.2 In-fusion cloning

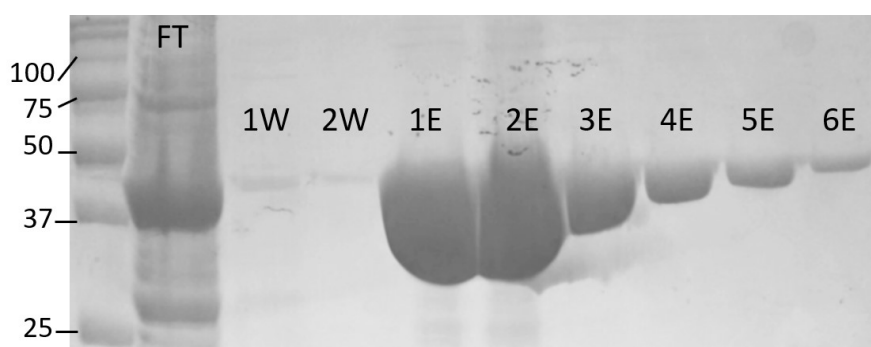
Nejprve byly amplifikovány nové sekvence templátů fúzních proteinů prodloužené o 15 bp (úsek komplementární s expresním vektorem). Amplifikace byla úspěšná u všech tří fúzních proteinů. Všechny PCR produkty v oblasti cca 150 bp byly vyříznuty, přečištěny a odeslány na sekvenaci. Sekvenací bylo potvrzeno, že se podařilo amplifikovat celé sekvence templátů a následně tedy mohlo být přistoupeno k ligaci těchto insertů do expresního vektoru.

5.2.3 Ověření přítomnosti exprimovaného proteinu a jeho purifikace

Po ověření přítomnosti insertu sekvenací byla provedena exprese a následná elektroforéza na polyakrylamidovém gelu, s jejíž pomocí bylo zjištěno, že se fúzní proteiny budou pravděpodobně nacházet v supernatantu.

Purifikace proteinu – afinitní chromatografie

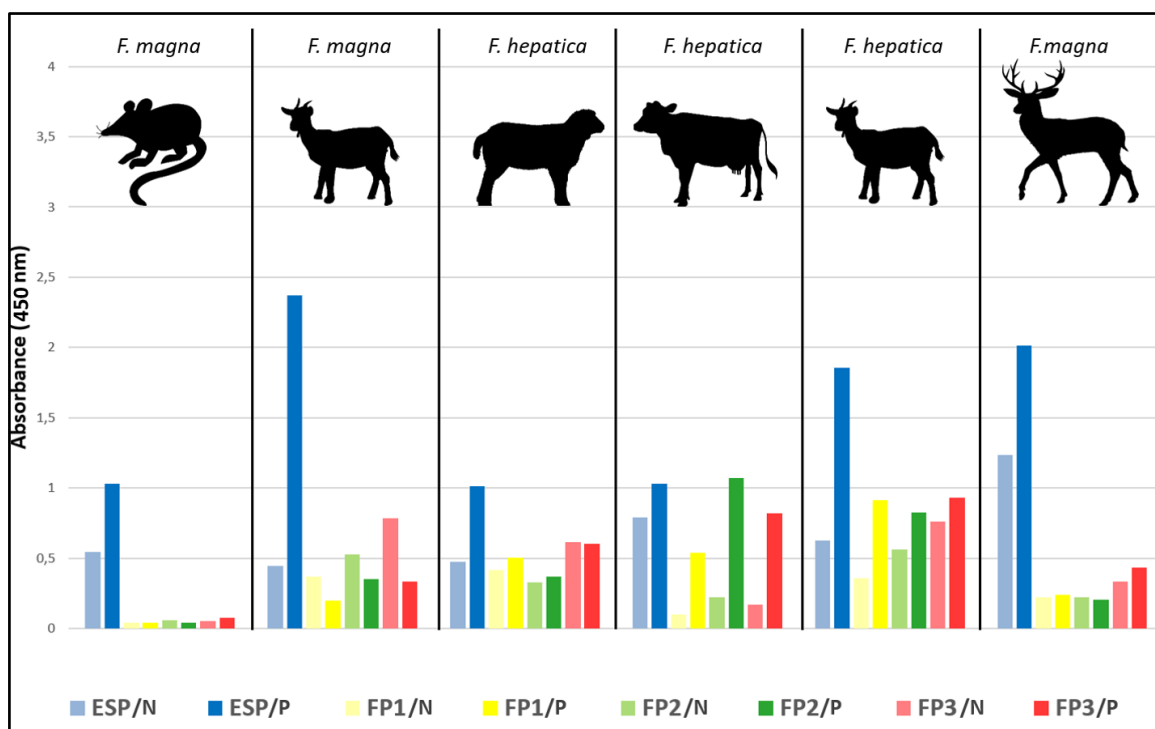
Pomocí afinitní chromatografie se podařilo purifikovat všechny tři fúzní proteiny. Jako příklad je znázorněna purifikace fúzního proteinu 2 (obr. 14). Koncentrace vzorku u každé eluce byla měřena na fluorometru. U poslední (nejčistější) eluce byla naměřena koncentrace 0,7 µg/µl (pro fúzní protein 1), 0,5 µg/µl (pro fúzní protein 2) a 0,42 µg/µl (pro fúzní protein 3).



Obrázek 14 - Purifikace fúzního proteinu 2: pozitivní bandy by měly být v oblasti 50 kDa; FT "flow through" (první sběr, který protekl kolonou), 1W (první přidání promývacího pufru), 2W (druhé přidání promývací pufru), 1E - 6E (jednotlivé eluce)

5.2.4 ELISA

Metodou ELISA byla pomocí spektrofotometrického měření sledována hladina protilátek IgG u jednotlivých druhů zvířat infikovaných motolicemi *F. hepatica* nebo *F. magna*. Jako kontrola byly využity ESP obou motolic, s nimiž reagovala všechna séra. V případě rekombinantních proteinů byl značný rozdíl mezi negativním a pozitivním sérem zaznamenán u býka infikovaného *F. hepatica*. K reakci došlo i v případě kozy a berana nakažených *F. hepatica*, avšak rozdíl mezi negativním a pozitivním sérem byl zanedbatelný. U zvířat infikovaných *F. magna* (jelen, potkan) nebyla v případě rekombinantních proteinů pozorována žádná reakce. Tato séra reagovala pouze v případě ESP. U kozy infikované *F. magna* byla zaznamenána opačná reakce. Hodnoty naměřené v případě pozitivního séra byly vyšší než hodnoty naměřené u negativního séra. Reakce pozorované u jednotlivých druhů zvířat znázorňuje graf 3.



Graf 3 – Měření hladiny IgG protilátek pomocí ELISA testu: znázorněna jsou jednotlivá zvířata infikovaná příslušnou motolicí z nichž byla využita jejich séra, ESP (exkrečně-sekreční produkty motolic), FP1-3 (fúzní protein 1-3); N/P (negativní, pozitivní sérum), použité ředění 1:100

6 Diskuze

Tato práce se zabývala problematikou diagnostiky fasciolidních motolic s cílem navrhnout a sestrojit přesně definovanou syntetickou antigenní molekulu (rekombinantní fúzní protein). Navržený fúzní protein, s vysokou specifitou, by pak mohl zastoupit antigeny využívané v sérodiagnostice těchto motolic.

6.1 Bioinformatická analýza

Cílem bioinformatické části předkládané práce bylo navrhnout postup umožňující predikci sekretovaných molekul z transkriptomových dat motolice *F. magna* a následně definovat exkrečně-sekreční produkty (ESP) tohoto parazita, jejichž antigenní epitopy by mohly být využity k sestrojení rekombinantních fúzních proteinů.

6.1.1 Predikce *in silico* sekretomu

Z transkriptomu *F. magna* (17 182 transkriptů) se podařilo predikovat 700 sekretovaných molekul – *in silico* sekretom. Predikce byla provedena s využitím volně dostupného webového programu PECAS (Cantacessi et al., 2012a), který identifikuje molekuly sekretované klasickou sekreční dráhou na základě vlastností typických pro tyto molekuly (signální sekvence, subcelulární lokalizace, transmembránové domény). Pro zhodnocení výsledků predikčního programu PECAS byl použit transkriptom *F. magna*, který byl dříve identifikován a využit pro predikci sekretovaných molekul u této motolice (Cantacessi et al., 2012a). V rámci tohoto staršího výzkumu byla provedena bioinformatická analýza, při níž bylo identifikováno 835 sekretovaných molekul. Tato predikce však byla založena pouze na přítomnosti signální sekvence s využitím bioinformatického nástroje SignalP. Právě odlišnost zvolených bioinformatických nástrojů vedla k rozdílným výsledkům počtu identifikovaných sekretovaných molekul. PECAS sdružuje několik predikčních nástrojů, a proto je výsledný soubor nalezených molekul v této práci menší, zároveň by měl poskytovat přesnější výsledky. Nástroje, které jsou součástí programu PECAS, se totiž zaměřují na více vlastností sekretovaných molekul. Využití programu PECAS není jedinou možností, jak predikovat sekretované molekuly. Pro predikci jsou často využívány samostatné nástroje jako např. již zmíněný SignalP (predikce signální sekvence), TargetP (predikce subcelulární lokalizace proteinu)

nebo TMHMM (predikce transmembránových domén) (Emanuelsson et al., 2000; Krogh et al., 2001; Petersen et al., 2011), jedná se však o programy predikující dílčí vlastnosti sekretovaných proteinů. Program PECAS výše uvedené nástroje sdružuje, čímž usnadňuje analýzu sekretovaných molekul, a to bylo jedním z hlavních důvodů proč byl program v předkládané práci testován. Další velkou výhodou tohoto programu je, že predikce s jeho pomocí nevyžaduje znalost příkazového řádku. PECAS je proto více uživatelsky přívětivý, zároveň umožňuje analyzovat velké množství dat (vstupní soubor určený pro predikci může obsahovat až 20 000 sekvencí).

Nicméně, existují i nástroje, které jsou schopné predikovat molekuly sekretované alternativní sekreční dráhou (na rozdíl od PECAS), např. SecretomeP (Bendtsen et al., 2004). Ten však v této práci využit nebyl. Je zřejmé, že pokud by v předkládané práci byla využita kombinace nástrojů predikující klasicky i alternativně sekretované molekuly, bylo by pravděpodobně dosaženo lepších výsledků. Toto tvrzení potvrzuje predikce sekretovaných molekul s využitím predikčních nástrojů jak pro klasickou, tak pro alternativní sekreci u *Taenia solium* (Gomez et al., 2015). V rámci této studie bylo predikováno 731 proteinů sekretovaných klasickou sekreční dráhou programem SignalP a s využitím nástroje SecretomeP bylo predikováno 543 proteinů sekretovaných alternativní sekreční dráhou. Obě tyto skupiny byly dále analyzovány pomocí TargetP predikujícího subcelulární lokalizaci a TMHMM predikujícího transmembránové domény. Celkem tedy bylo analyzováno 838 sekretovaných proteinů (Gomez et al., 2015).

Využití programu PECAS má mnoho výhod, jednou z nich je velká kapacita pro vstupní data. Nevýhodou je, že predikuje pouze molekuly sekretované klasickou sekreční dráhou, což není optimální. Přestože výstupní soubor nezahrnuje molekuly sekretované alternativní sekreční dráhou, můžeme PECAS považovat za užitečný predikční nástroj s jednoduchým použitím bez znalosti programování.

6.1.2 Anotace *in silico* sekretomu

Ze 700 predikovaných sekretovaných molekul v této práci (*in silico* sekretom) se pomocí databáze NCBI s využitím BLASTp podařilo anotovat 296 proteinů, zbylých 404 proteinů se anotovat nepodařilo. I když tyto proteiny zůstaly neznámé, bylo zřejmé, že obsahují vlastnosti typické pro molekuly sekretované klasickou sekreční dráhou a tedy

pravděpodobné, že se jedná o reálné molekuly, které by mohly vykazovat antigenní vlastnosti, a být využity při diagnostice fasciolidních motolic. Nejvíce zastoupenou složkou sekretovaných molekul u fasciolidních motolic (*F. hepatica*, *F. magna* a *F. gigantica*) jsou cysteinové proteázy (Robinson et al., 2009; Cantacessi et al., 2012a; Di Maggio et al., 2016).

V ESP fasciolidních motolic se nacházejí zejména katepsiny, jejichž přítomnost je rozhodující z hlediska trávení krve, která je základní složkou potravy parazita (Dalton et al., 2003). Katepsiny se dále účastní migrace parazita hostitelskou tkání a podílí se také na vyvolání imunitní odpovědi hostitele (Berasáin et al., 1997; Dalton et al., 2003). Skutečnost, že nejvíce zastoupenou složkou sekretovaných molekul u fasciolidních motolic jsou cysteinové proteázy, z nichž převážnou část tvoří katepsiny byla potvrzena pomocí databáze MEROPS (databáze peptidáz a jejich inhibitorů), kterou bylo predikováno 42 peptidáz a jejich 19 inhibitorů.

6.1.3 Srovnání *in silico* sekretomu s proteomem exkrečně-sekrečních produktů

Vzhledem k tomu, že pro další část práce bylo třeba najít molekulu, která by byla využitelná při diagnostice fasciolidních motolic, tedy schopna vyvolat imunitní odpověď, bylo cílem určit, které z molekul v *in silico* sekretomu (700 predikovaných sekretovaných molekul) se dostávají do kontaktu s hostitelem. K tomu sloužilo porovnání s již známým ESP proteomem *F. magna* identifikovaným hmotnostní spektrometrií (80 proteinů) (Cantacessi et al., 2012a). Pomocí bioinformatické analýzy v této práci se podařilo identifikovat 31 z 80 známých proteinů nacházejících se v ESP. Hlavním důvodem nižšího počtu identifikovaných proteinů (31) je zřejmě to, že PECAS predikuje molekuly sekretované klasickou sekreční dráhou, tedy putující přes endoplazmatické retikulum do Golgiho aparátu a exocytózou ven z buňky. Ne všechny proteiny dostávající se ven z buňky se však skutečně dostávají ven z těla parazita v podobě ESP. Typickým příkladem je sekrece neurotransmitérů, které jsou sekretovány klasickou sekreční dráhou, ale do ESP parazita se nedostávají (Purves et al., 2001).

6.1.4 Predikce antigenních epitopů a navržení fúzních proteinů

Aby byla vytvořena jasně definovaná molekula, použitelná pro diagnostiku fasciolidních motolic byla nutná podrobnější analýza na úrovni antigenních epitopů, což jsou konkrétní oblasti antigenu, na které se specificky vážou protilátky. Hlavní myšlenkou při tvorbě takové molekuly bylo predikovat antigenní epitopy u proteinů, jenž byly pomocí vlastní analýzy identifikovány v ESP (31 proteinů). Na základě několika kritérií byly vybrány antigenní úseky u několika proteinů. Výsledkem bylo navržení tří rekombinantních fúzních proteinů, které by mohly být využitelné pro diagnostiku *F. magna* nebo *F. magna* a *F. hepatica*.

Hlavním kritériem bylo stanovení míry antigenicity pomocí programu LBTOPE. Výhodou tohoto programu je, že může predikovat velké množství dat najednou, výsledný soubor pak přehledně zobrazuje sekvence jednotlivých proteinů s barevně vyznačeným stupněm antigenicity. Tento program byl využit např. v kombinaci s programem BepiPred při predikci antigenních epitopů u *Trypanosoma vivax*, aby však mohla být sledována účinnost této predikce byla by zapotřebí validace tohoto experimentu (Guedes et al., 2018). Postup při predikci antigenních epitopů v jednotlivých výzkumech se značně liší. Příkladem je predikce antigenních oblastí u *T. solium* (Gomez et al., 2015), kde byla využita kombinace metod CBTOPE, BepiPred (predikce z primární sekvence proteinu) (Larsen et al., 2006; Ansari & Raghava, 2010) a Kolaskar a Tongaonkar (empirická metoda pro určení antigenních determinant) (Kolaskar and Tongaonkar, 1990). Nelze však odhadnout, který z popsaných postupů by byl pro predikci nejlepší. Jelikož nelze hodnotit nakolik byla predikce antigenních epitopů přesná, bylo zvoleno druhé kritérium – pokusit se najít publikace, kde byl zkoumán antigenní účinek proteinů identifikovaných v této práci (31 proteinů). Je nutné brát v potaz, že nalezeny byly publikace, ve kterých byl zkoumán antigenní účinek celého proteinu, nikoliv jednotlivých antigenních epitopů. Důležitou vlastností antigenního proteinu je jeho specifita. Aby nedocházelo ke zkřížené reakci, kdy bude zhotovený protein reagovat na jiné druhy parazitů, bylo nutné stanovit homologii antigenních epitopů s jednotlivými druhy motolic, s cílem najít epitopy s homologií pro *F. magna* a *F. hepatica*. Zkřížená reaktivita je totiž obecným problémem omezující specifitu diagnostických metod (Meshgi et al., 2018)(Martínez-Sernández et al., 2018).

Na základě těchto kritérií byly z identifikovaných ESP v této práci (31 proteinů) vybrány antigenní epitopy jež sloužily ke konstrukci dvou rekombinantních fúzních proteinů. Vzhledem k tomu, že navržené rekombinantní fúzní proteiny obsahovaly epitopy ze známých proteinů, byla snaha i o zkoumání neznámých proteinů. V tomto případě bylo nutné vrátit se na začátek bioinformatické analýzy, kde byl pomocí programu PECAS predikován *in silico* sekretom (700 sekretovaných proteinů), přičemž některé proteiny v sekretomu se podařilo anotovat, avšak více než polovina (404) jich zůstala neznámých. Hlavním důvodem bylo, že i tyto neznámé proteiny byly pomocí programu PECAS predikovány jako sekretované a odhalení jejich antigenního účinku by vedlo k pozitivnímu hodnocení tohoto programu. Dalším krokem tak bylo navržení třetího rekombinantního fúzního proteinu, skládajícího se ze třech antigenních epitopů vybraných z těchto neznámých proteinů. Jelikož nebylo možné ověřit antigenicitu v existujících publikacích a k dispozici byla jen predikce antigenních epitopů pomocí programu LBTOPe, bylo nutné přidat další kritérium, které by výběr těchto epitopů zjednodušilo. U neznámých proteinů byla proto stanovena míra exprese, opět s využitím bioinformatické analýzy. Predikční nástroj RSEM nabízí *in silico* alternativu k laboratorní metodě real-time PCR tím, že odhadne abundanci proteinů, opět bez nutnosti laboratorní práce. Třetí rekombinantní fúzní protein se tak skládal z antigenních epitopů neznámých proteinů s vysokou mírou exprese.

6.2 Laboratorní analýza

Cílem laboratorní části předkládané práce bylo vyrobit syntetickou multiantigenní molekulu navrženou v bioinformatické části a otestovat její antigenicitu pomocí imunologické metody ELISA.

6.2.1 Exprese a purifikace rekombinantního fúzního proteinu

Kombinací fúzní a klasické PCR se podařilo amplifikovat navržené templáty fúzních proteinů o velikosti cca 130 bp, což bylo potvrzeno sekvenací. Při tvorbě navržených rekombinantních fúzních proteinů v této práci je hlavním přínosem to, že abychom tyto syntetické molekuly vyrobili není zapotřebí parazitárního organismu (parazitární DNA). Pro jejich navržení stačí pouze volně dostupná data (genomová, transkriptomová). Dalším krokem byla ligace insertu do klonovacího a následně do expresního vektoru. Pro expresi rekombinantního fúzního proteinu jsou široce využívány bakterie *E. coli*, a to z důvodu nízké ceny a snadného použití. V této práci byl pro zhotovení rekombinantních fúzních proteinů zvolen právě tento bakteriální expresní systém. Hlavním důvodem bylo, že pro tuto analýzu nebylo třeba vytvořit aktivní protein, nebyl tedy nutný refolding, který je zapotřebí, pokud je protein exprimován do inkluzních tělísek. V takových případech mohou být alternativou ve volbě expresního systému např. kvasinky, které jsou nejen levné a rychle exprimují daný protein, ale navíc umožňují post-translační modifikace důležité pro biologickou funkčnost proteinu (Nielsen, 2013). Během polyakrylamidové elektroforézy bylo zjištěno, že se exprimované fúzní proteiny nacházejí v supernatantu. Purifikace pak byla provedena navázáním niklových kuliček Ni-NTA-Agarose (Quiagen) na histidinovou kotvu, která byla součástí expresního vektoru. His-tag je nejběžnější afinitní značkou, kterou lze provádět snadnou izolaci a purifikaci proteinu. Mezi afinitní značky patří také MBP (Maltose-binding-protein) (di Guan et al., 1988). Nejvyšší úspěch MBP vykazuje jako proteinový nosič (Moon et al., 2010), čehož bylo využito i v případě této práce. Maltose-binding protein může zvyšovat rozpustnost rekombinantních proteinů nebo, v kombinaci s jinými afinitními značkami, zjednodušovat jejich purifikaci. Často tak může být využit pro purifikaci obtížně purifikovatelných proteinů (Bell et al., 2013; Riley et al., 2013). Purifikace pomocí MBP je umožněna vazbou na amylózu. Nicméně, ne všechny fúzní proteiny se na amylózovou pryskyřici účinně vážou a pokud se navážou, není jisté, že bude získán vzorek

s odpovídající čistotou (Routzahn and Waugh, 2002). Z tohoto důvodu byla v předkládané práci zvolena purifikace pomocí histidinové kotvy. Výsledkem bylo získání tří rekombinantních proteinů, jejichž přítomnost byla ověřena a potvrzena odesláním vzorků na hmotnostní spektrometrii. U všech tří fúzních proteinů tedy mohla být následně zkoumána jejich antigenicita.

6.2.2 Testování antigenicity rekombinantních fúzních proteinů

Sérodiagnostika je v současnosti pro detekci infekčního agens preferovaná (Gonzales Santana et al., 2013). Jedna ze serologických metod je ELISA založená na reakci antigen-protilátka, která byla vybrána pro zkoumání antigenního účinku vytvořených rekombinantních fúzních proteinů v této práci. Antigenní účinek rekombinantních fúzních proteinů u zvířat nakažených *F. magna* však nebyl zaznamenán, i když byly rekombinanty navrženy tak, aby byly pro diagnostiku *F. magna* specifické. K reakci došlo pouze v případě zvířat nakažených *F. hepatica*. Vzhledem k tomuto výsledku se nabízí několik příčin, které mohly v průběhu práce nastat.

Prvním možným vysvětlením toho, že vytvořené rekombinantní fúzní proteiny se séry zvířat infikovaných *F. magna* nereagují, mohlo být špatné navržení fúzních proteinů. Chyba mohla nastat již ve fázi predikce s využitím bioinformatického nástroje LBTOPE (Singh et al., 2013) jenž nemusel antigenní epitopy správně vyhodnotit. Řešením by pak mohlo být využití většího množství nástrojů predikujících antigenní epitopy (Gomez et al., 2015; Guedes et al., 2018). Možné by bylo také predikovat antigenní epitopy na základě jejich 3D struktury (Haste Andersen et al., 2006). V této práci však byla snaha o predikci antigenních epitopů na základě aminokyselinového úseku (Haste Andersen et al., 2006). Pro definitivní výběr antigenních epitopů byla zohledněna i další kritéria, např. jestli je antigenní epitop součástí proteinu se známou antigenicitou (ověřováno z jednotlivých publikací). V současnosti jsou totiž prováděny výzkumy zaměřující se přímo na účinek jednotlivých antigenních epitopů, jenž jsou součástí proteinů nacházejících se v ESP. Cílem bioinformatické části této práce bylo však zejména ověřit účinnost některých predikčních nástrojů, proto byly zvoleny antigenní epitopy nezávisle na tom, jestli byl jejich antigenní účinek někdy zkoumán.

Dalším možným opatřením při konstrukci fúzních proteinů je navržení specifických linkerů, krátkých aminokyselinových sekvencí sloužících k oddělení jednotlivých antigenních epitopů (Reddy Chichili et al., 2013). Obecně lze linkery dělit na flexibilní,

bohaté na malé nebo polární aminokyseliny (Serin, Glycin), které poskytují proteinu dobrou „pružnost“ a rozpustnost (Waldo et al., 1999; Sabourin et al., 2007). V některých případech však použití tohoto typu linkerů vedlo ke ztrátě biologické aktivity a nízkým výnosům exprese (Amet et al., 2009). Efektivnější se zdají být tuhé linkery, které by měly být výhodnější právě pro zachování stability a bioaktivity, nebo *in vivo* štěpitelné linkery, jejichž konstrukce je však náročnější (Chen et al., 2013). K dispozici jsou také databáze pro návrh linkerů (Crasto and Feng, 2000). Obecnou vlastností linkerů je tedy udržení stability, zvýšení biologické aktivity nebo zvýšení produkce proteinu (Chen et al., 2013). Aby bylo možné tvrdit, že právě linkery, jež nebyly v této práci použity, byly hlavním problémem při konstrukci rekombinantních fúzních proteinů, bylo by třeba vyzkoušet, jak se séry infikovaných zvířat reagují vybrané antigenní epitopy jednotlivě.

V případě některých zvířat infikovaných *F. hepatica* však k reakci došlo. Největší reakce byla zaznamenána u býka přirozeně nakaženého *F. hepatica*. Podobně tomu bylo i v případě berana nakaženého *F. hepatica*. V případě kozy nakažené *F. hepatica* byla reakce zřetelná, a to i u rekombinantního fúzního proteinu, který byl specificky navržen pro diagnostiku *F. magna*. To opět potvrzuje, že výběr antigenních epitopů zřejmě nebyl správný. Je nutné dodat, že i samotný MBP využitý pro purifikaci fúzních proteinů může mít antigenní účinek v případě vyloučení falešně pozitivních výsledků by ho tedy bylo vhodné z fúzních proteinů odštěpit (Gurung et al., 2013). V této práci MBP odštěpen nebyl, jelikož výsledky testování antigenicity nebyly hodnotitelné.

V této práci se podařilo zaznamenat reakci vytvořených fúzních proteinů u zvířat nakažených *F. hepatica*, u zvířat infikovaných *F. magna* nikoliv. Kromě výše uvedených příčin, mohla být důvodem neúspěchu i nefunkčnost sér zvířat nakažených *F. magna*. Séra byla shromažďována v laboratoři v období mezi roky 2011-2016, jednalo se o zvířata infikovaná přirozeně i experimentálně. Toto tvrzení ale bylo vyvráceno použitím kontrolního antigenu (ESP *F. magna*), se kterým všechna séra reagovala. Navíc u kozy infikované *F. magna* byla zaznamenána vyšší reaktivita u negativního séra, a to i při opakovaném testování, což by mělo vyloučit laboratorní chybu. V tomto případě je možná kontaminace vzorku, ale je také možné, že vzorky byly v předchozích letech nesprávně označeny.

7 Závěr

Díky pokrokům v sekvenačních technologiích, a tedy dostupnosti velkého množství dat (genomová, transkriptomová, proteomová) je v současné době možné navrhovat a vyrábět množství molekul, které by mohly být potencionálně využity pro diagnostiku fasciolidních motolic.

V této práci se podařilo:

- predikovat molekuly sekretované klasickou sekreční dráhou u motolice *F. magna*, z nichž byly následně definovány molekuly nacházející se v exkrečně-sekrečních produktech tohoto parazita
- predikovat antigenní epitopy vybraných sekretovaných proteinů, které byly využity k návrhu rekombinantního fúzního proteinu
- vytvořit 3 rekombinantní fúzní proteiny u nichž byla testovaná jejich antigenicita

V této práci se však nepodařilo sestavit rekombinantní fúzní protein tak, aby mohl být využit pro diagnostiku *F. magna* nebo *F. hepatica*. Problémy, které v průběhu práce nastaly, upozornily na možné nedostatky zejména při predikci antigenních epitopů a dále při navrhování a výrobě fúzního proteinu.

Všechny tyto poznatky by mohly vést k návrhu a výrobě fúzního proteinu, který by byl pro tyto druhy motolic specifický.

Seznam použité literatury

50 Helminth Genomes Project (50HGP) | Wellcome Sanger Institute. Home Page [online]. Available from: <https://www.sanger.ac.uk/science/collaboration/50hgp>

Acici M., Buyuktanir O., Bolukbas C. S., Pekmezci G. Z., Gurler A. T., Umur S. (2015). Serologic detection of antibodies against *Fasciola hepatica* in sheep in the middle Black Sea region of Turkey. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*, 50, 377-381.

Amet N., Lee H.-F., Shen W.-C. (2009). Insertion of the designed helical linker led to increased expression of tf-based fusion proteins. *Pharmaceutical research*, 26, 523–8.

Ansari H., Raghava G. P. (2010). Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Research*, 6, 6.

Bartůňková J., Paulík M. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-0691-1.

Bell M. R., Engleka M. J., Malik A., Strickler J. E. (2013). To fuse or not to fuse: What is your purpose? *Protein Science*, 22, 1466–1477.

Bendtsen J. D., Jensen L. J., Blom N., von Heijne G., Brunak S. (2004). Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design and Selection*, 17, 349–356.

Bendtsen J. D., Kiemer L., Fausbøll A., Brunak S. (2005). Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC microbiology*, 5, 58.

Bentley, D. R. et al. (2008) ‘Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry’, *Nature*. Nature Publishing Group, 456, 53-59.

Beránková K. Vlastnosti exkrečně-sekrečních proteinů motolice *Fascioloides magna*. Praha 2011. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra parazitologie.

Berasain P., Goñi F., McGonigle S., Dowd A., Dalton J. P., Frangione B., Carmona C. (1997). Proteinases secreted by *Fasciola hepatica* degrade extracellular matrix and basement membrane components. *The Journal of parasitology*, 83, 1–5.

Berasain P., Carmona C., Frangione B., Dalton J.P., Goni F. (2000) *Fasciola hepatica*: Parasite-Secreted Proteinases Degrade All Human IgG Subclasses: Determination of the Specific Cleavage Sites and Identification of the Immunoglobulin Fragments Produced, *Experimental Parasitology*, 94, 99–110.

Berger S., Lowe P., Tesar M. (2015) Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: Applications and challenges, *mAbs*. Taylor & Francis, 7, 456–460.

Besser J., Carleton H. A., Gerner-Smidt P., Lindsey R. L., Trees E. (2018). Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 24, 335–341.

Bonin-Debs A. L., Boche I., Gille H., Brinkmann U. (2004). Development of secreted proteins as biotherapeutic agents. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4, 551–558.

- Bozas S. E., Panaccio M., Creaney J., Dosen M., Parsons J. C., Vlasuk G. V., Walker I. D., Spithill T. W.** (1995) Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 74, 19–29.
- Brindley P. J., Mitreva M., Ghedin E., Lustigman S.** (2009). Helminth Genomics: The Implications for Human Health. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3, e538.
- Cantacessi C., Mulvenna J., Young N. D., Kasny M., Horak P., Aziz A., Hofmann A., Loukas A., Gasser R. B.** (2012a). A deep exploration of the transcriptome and excretory/secretory proteome of adult *Fascioloides magna*. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 11, 1340–53.
- Cantacessi C., Campbell B. E., Jex A. R., Young N. D., Hall R. S., Ranganathan S., Gasser R. B.** (2012b) Bioinformatics meets parasitology, *Parasite Immunology*, 34, 265–275.
- Cervi, L. et al.** (2009) New Insights into the Modulation of Immune Response by *Fasciola hepatica* Excretory-Secretory Products, *Current Immunology Reviews*, 5, 277–284.
- Cornelissen J. B., Gaasenbeek C. P., Boersma W., Borgsteede F. H., van Milligen F. J.** (1999) Use of a pre-selected epitope of cathepsin-L1 in a highly specific peptide-based immunoassay for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *International journal for parasitology*, 29, 685–96.
- Cortazar A. R., Oguiza J. A., Aransay A. M., Lavin J. L.** (2015) ‘PECAS: prokaryotic and eukaryotic classical analysis of secretome’, *Amino Acids*, 47, 2659–2663.
- Cortazar A. R., Oguiza J. A., Aransay A. M., Lavin J. L.** (2017) VerSeDa: vertebrate secretome database. Database : the journal of biological databases and curation. Oxford University Press, 2017(1).
- Cox J., Mann M.** (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification, *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 26,1367–1372.
- Crossley I. R., Neuberger J., Davis M., Williams R., Eddleston A. L.** (1986) Ethanol metabolism in the generation of new antigenic determinants on liver cells. *Gut*. BMJ Publishing Group, 27, 186–9.
- Crasto C. J., Feng J. A.** (2000). LINKER: a program to generate linker sequences for fusion proteins. *Protein engineering*, 13, 309–12.
- Cuomo M. J., Noel L. B., White D. B.** (2009) Diagnosing Medical Parasites: A Public Health Officers Guide to Assisting Laboratory and Medical Officers. Available at: <http://www.dtic.mil/docs/citations/ADA596737> (Accessed: 11 August 2018).
- Cwiklinski K., Dalton J. P., Dufresne P., La Course J., Williams D. J., Hodgkinson J., Paterson S.** (2015) The *Fasciola hepatica* genome: gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome biology*. BioMed Central, 16, 71.

- Dalton J. P., Neill S. O., Stack C., Collins P., Walshe A., Sekiya M., Doyle S., Mulcahy G., Hoyle D., Khaznadji E., Moiré N., Brennan G., Mousley A., Kreshchenko N., Maule A. G., Donnelly S. M.** (2003). *Fasciola hepatica* cathepsin L-like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International journal for parasitology*, 33, 1173–81.
- di Guan C., Li P., Riggs P. D., Inouye H.** (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene*, 67, 21–30.
- Di Maggio L. S., Tirloni L., Pinto A. F. M., Diedrich J. K., Yates III J. R., Benavides U., Carmona C., da Silva Vaz I., Berasain P.** (2016). Across intra-mammalian stages of the liver fluke *Fasciola hepatica*: a proteomic study. *Scientific Reports*, 6, 32796.
- Dorchies P.** (2007). Comparison of Methods for the Veterinary Diagnosis of Liver Flukes (*Fasciola Hepatica*) in Cattle. *Bulletin USAMV-CN*, 64, 14–19.
- Doubek J.** (2003). *Veterinární hematologie*. Brno: Noviko, 2003. ISBN 80-86542-02-5.
- El Ridi R., Salah M., Wagih A., William H., Tallima H., El Shafie M. H., Abdel Khalek T., El Amir A., Abo Ammou F. F., Motawi H.** (2007). *Fasciola gigantica* excretory-secretory products for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis. *Veterinary parasitology*, 149, 219–28.
- Emanuelsson O., Nielsen H., Brunak S., von Heijne G.** (2000). Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300, 1005–1016.
- Erhardová - Kotrlá B.** (1971). The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. *Prague: Academia*, 1971, 155.
- Escalante H., Davelois K., Ortiz P., Rodríguez H., Díaz E., Jara C.** (2011). Western blot technique standardization of the diagnosis of human fasciolosis using *Fasciola hepatica* excreted-secreted antigens. *Revista peruana de medicina experimental y salud publica*, 28, 454–61.
- Fagerberg L., Jonasson K., von Heijne G., Uhlén M., Berglund L.** (2010) Prediction of the human membrane proteome, *PROTEOMICS*, 10, 1141–1149.
- Fachiroh J., Paramita D. K., Hariwiyanto B., Harijadi A., Dahlia H. L., Indrasari S. R., Kusumo H., Zeng Y. S., Schouten T., Mubarika S., Middeldorp J. M.** (2006) Single-assay combination of Epstein-Barr Virus (EBV) EBNA1- and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening, *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 44, 1459–67.
- Falcón C. R., Masih D., Gatti G., Sanchez M. C., Motrán C. C., Cervi L.** (2014) *Fasciola hepatica* Kunitz Type Molecule Decreases Dendritic Cell Activation and Their Ability to Induce Inflammatory Responses, *PLoS ONE*. Edited by J. Bayry, 9, e114505.
- Ferrer E., Benitez L., Foster-Cuevas M., Bryce D., Wamae L. W., Onyango-Abuje J. A., Garate T., Harrison L. J. S., Parkhouse R. M. E.** (2003) *Taenia saginata* derived synthetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis, *Veterinary parasitology*, 111, 83–94.

- Francisco C. J., Hermida M. A., Santos M. J. (2012)** *Proisorhynchus crucibulum* (Digenea: Bucephalidae) miracidium morphology and its passive transmission pattern, Parasite (Paris, France). EDP Sciences, 19, 277–80.
- Gomez S., Adalid-Peralta L., Palafox-Fonseca H., Cantu-Robles V. A., Soberón X., Sciutto E., Fragoso G., Bobes R. J., Laclette J. P., Yauner L. del P., Ochoa-Leyva A. (2015).** Genome analysis of Excretory/Secretory proteins in *Taenia solium* reveals their Abundance of Antigenic Regions (AAR). Scientific Reports, 5, 9683.
- Gonzales Santana B., Dalton J. P., Vasquez Camargo F., Parkinson M., Ndao M. (2013).** The diagnosis of human fascioliasis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant cathepsin L protease. PLoS neglected tropical diseases, 7, e2414.
- Gottstein B., Schneeberger M., Boubaker G., Merkle B., Huber C., Spiliotis M., Muller N., Garate T., Doherr M. G. (2014)** Comparative Assessment of ELISAs Using Recombinant Saposin-Like Protein 2 and recombinant Cathepsin L-1 from *Fasciola hepatica* for the Serodiagnosis of Human Fasciolosis, PLoS Neglected Tropical Diseases. Edited by P. J. Lammie, 8, e2860.
- Govindarajan R., Duraiyan J., Kaliyappan K., Palanisamy M. (2012)** Microarray and its applications, Journal of pharmacy & bioallied sciences. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 4, S310-2.
- Greenbaum D., Luscombe N. M., Jansen R., Qian J., Gerstein M. (2001)** Interrelating different types of genomic data, from proteome to secretome: oming in on function, Genome research. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11,1463–8.
- Guedes R. L. M., Rodrigues C. M. F., Coatnoan N., Cosson A., Cadioli F. A., Garcia H. A., Gerber A. L., Machado R. Z., Minoprio P. M. C., Teixeira M. M. G., de Vasconcelos A. T. R. (2018).** A comparative *in silico* linear B-cell epitope prediction and characterization for South American and African *Trypanosoma vivax* strains. Genomics, S0888-7543, 30126-5.
- Gupta P. K., Mukherjee P., Dhawan S., Pandey A. K., Mazumdar S., Gaur D., Jain S. K., Chauhan V. S. (2014)** Production and preclinical evaluation of *Plasmodium falciparum* MSP-119 and MSP-311 chimeric protein, PfMSP-Fu24, Clinical and vaccine immunology : CVI. American Society for Microbiology (ASM), 21, 886–97.
- Gurung R. B., Begg D. J., Purdie A. C., Bannantine J. P., Whittington R. J. (2013).** Antigenicity of recombinant maltose binding protein-*Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis fusion proteins with and without factor Xa cleaving. Clinical and vaccine immunology : CVI, 20, 1817–26.
- Horton P., Park K., Obayashi T., Fujita N., Harada H., Adams-Collier C. J., Nakai K. (2007)** WoLF PSORT: protein localization predictor, Nucleic acids research. Oxford University Press, 35, W585-7.
- Haste Andersen P., Nielsen M., Lund O. (2006).** Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. Protein science : a publication of the Protein Society, 15, 2558–67.

- Charlier J., De Cat A., Forbes A., Vercruysse J.** (2009) Measurement of antibodies to gastrointestinal nematodes and liver fluke in meat juice of beef cattle and associations with carcass parameters, *Veterinary parasitology*, 166, 235–40.
- Charlier J., Vercruysse J., Morgan E., van Dijk J., Williams D. J. L.** (2014) Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle, *Parasitology*, 141, 326–35.
- Chen X., Zaro J. L., Shen W.-C.** (2013). Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Advanced drug delivery reviews*, 65, 1357–69.
- Jenkins S. J., Hewitson J. P., Jenkins G. R., Mountford A. P.** (2005). Modulation of the host's immune response by schistosome larvae. *Parasite Immunology*, 27, 385–393.
- Jespersen M. C., Peters B., Nielsen M., Marcatili P.** (2017) BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes, *Nucleic Acids Research*, 45, W24–W29.
- Jíra J.** (1998). *Lékařská helmintologie Helmintoparazitární nemoci*. Praha: Galén, 1998, 495. ISBN 80-85824-82-5.
- Ju J.-W., Joo H., Lee M., Cho S., Cheun H., Kim J., Lee Y., Lee K., Sohn W., Kim D., Kim I., Park B. C., Kim T.** (2009) Identification of a serodiagnostic antigen, legumain, by immunoproteomic analysis of excretory-secretory products of *Clonorchis sinensis* adult worms, *PROTEOMICS*, 9, 3066–3078.
- Kamel H. H., Saad G. A., Sarhan R. M.** (2013). Dot-blot immunoassay of *Fasciola gigantica* infection using 27 kDa and adult worm regurgitate antigens in Egyptian patients. *The Korean journal of parasitology*, 51, 177–82.
- Kanehisa M., Sato Y., Morishima K.** (2016). BlastKOALA and GhostKOALA: KEGG Tools for Functional Characterization of Genome and Metagenome Sequences. *Journal of Molecular Biology*, 428, 726–731.
- Kaufmann J.** (1996). *Parasitic infections of domestic animals: a diagnostic manual*. Boston: Birkhäuser Verlag, c1996. ISBN 3764351152.
- Kelley J. M., Elliott T. P., Beddoe T., Anderson G., Skuce P., Spithill T. W.** (2016). Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends in Parasitology*, 32, 458–469.
- Kis Z., Pereira H. S., Homma T., Pedrigi R. M., Krams R.** (2015) Mammalian synthetic biology: emerging medical applications, *Journal of the Royal Society, Interface*. The Royal Society, 12.
- Knox, D. P.** (2007) Proteinase inhibitors and helminth parasite infection, *Parasite Immunology*, 29, 57–71.
- Kolaskar A. S., Tongaonkar P. C.** (1990). A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS letters*, 276, 172–4.
- Králová-Hromadová I., Juhásová E., Bazsalovicsová E.** (2016). *The giant liver fluke, Fascioloides magna*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2016. ISBN 978-3-319-29506-0.

- Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E. L. .** (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹¹Edited by F. Cohen. *Journal of Molecular Biology*, 305, 567–580.
- Kuerpick B., Schnieder T., Strube C.** (2013). Evaluation of a recombinant cathepsin L1 ELISA and comparison with the Pourquier and ES ELISA for the detection of antibodies against *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 193, 206–213.
- Kufner K., Lipps G.** (2013). Construction of a chimeric thermoacidophilic beta-endoglucanase. *BMC Biochemistry*, 14, 11.
- Larsen J. E. P., Lund O., Nielsen M.** (2006). Improved method for predicting linear B-cell epitopes. *Immunome research*, 2, 2.
- Leclipteux T., Torgerson P. R., Doherty M. L., McCole D., Protz M., Farnir F., Losson B.** (1998) Use of excretory/secretory antigens in a competition test to follow the kinetics of infection by *Fasciola hepatica* in cattle, *Veterinary parasitology*, 77, 103–14.
- Leontovyč R., Košťáková M., Siegelová V., Melounová K., Pankrác J., Vrbová K., Horák P., Kašný M.** (2014). Highland cattle and *Radix labiata*, the hosts of *Fascioloides magna*. *BMC veterinary research*, 10, 41.
- Li B., Dewey C. N.** (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome, *BMC Bioinformatics*. BioMed Central, 12, 323.
- Lightowlers M. W., Rickard M. D.** (1988). Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. *Parasitology*, 96, S123-66.
- List C., Qi W., Maag E., Gottstein B., Muller N., Felger I.** (2010) Serodiagnosis of *Echinococcus* spp. infection: explorative selection of diagnostic antigens by peptide microarray, *PLoS neglected tropical diseases*. Public Library of Science, 4, e771.
- Liu F., Cui S., Hu W., Feng Z., Wang Z., Han Z.** (2009) Excretory/secretory proteome of the adult developmental stage of human blood fluke, *Schistosoma japonicum*, *Molecular & cellular proteomics: MCP*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 8, 1236–51.
- Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P.** (1999). *Molecular Cell Biology* - University Harvey Lodish, University Arnold Berk, University Lawrence Zipursky, University Paul Matsudaira - Knihy Google. (H. F. Lodish, Ed.) (4th ed.). Freeman, W.H. & Company.
- Lotfy W. M., Brant S. V., DeJong R. J., Thanh H. Le, Demiaszkiewicz A., Rajapakse R. P. V. J., Perera V. B. V. P., Laursen J. R., Loker E. S.** (2008). Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 79, 248–255.
- Lu J., Holmgren A.** (2014) The thioredoxin antioxidant system, *Free Radical Biology and Medicine*. Pergamon, 66, 75–87.
- Lu H., Giordano F., Ning Z.** (2016) Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly, *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. Elsevier, 14, 265–279.

- Manocha M., Chitralekha K. T., Thakar M., Shashikiran D., Paranjape R. S., Rao D. N.** (2003) Comparing modified and plain peptide linked enzyme immunosorbent assay (ELISA) for detection of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) and type-2 (HIV-2) antibodies, *Immunology letters*, 85, 275–8.
- Marcilla M., Bargues M. D., Mas-Coma S.** (2002) A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*, *Molecular and cellular probes*, 16, 327–33.
- Margulies, M. et al.** (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors, *Nature*. Nature Publishing Group, 437, 376–380.
- Martínez-Sernández V., Perteguer M. J., Hernández-González A., Mezo M., González-Warleta M., Orbegoza-Medina R. A., Romarís F., Paniagua E., Gárate T., Ubeira F. M.** (2018). Comparison of recombinant cathepsins L1, L2, and L5 as ELISA targets for serodiagnosis of bovine and ovine fascioliasis. *Parasitology Research*, 117, 1521–1534.
- Mas-Coma S., Bargues M. D., Valero M.** (2005) Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses, *International Journal for Parasitology*, 35, 1255–1278.
- Mazeri S., Sargison N., Kelly R., Bronsvort B., H. I.** (2016) Evaluation of the Performance of Five Diagnostic Tests for *Fasciola hepatica* Infection in Naturally Infected Cattle Using a Bayesian No Gold Standard Approach, *PloS one*. Public Library of Science, 11, e0161621.
- McGarry J. W., Ortiz P. L., Hodgkinson J. E., Goreish I., Williams D. J. L.** (2007) ‘PCR-based differentiation of *Fasciola* species (Trematoda: Fasciolidae), using primers based on RAPD-derived sequences, *Annals of tropical medicine and parasitology*, 101, 415–21.
- Mehmood A. M.** (2014) Use of Bioinformatics Tools in Different Spheres of Life Sciences, *J Data Mining Genomics Proteomics*, 5(2).
- Meshgi B., Jalousian F., Fathi S., Jahani Z.** (2018). Design and synthesis of a new peptide derived from *Fasciola gigantica* cathepsin L1 with potential application in serodiagnosis of fascioliasis. *Experimental Parasitology*, 189, 76–86.
- Metzker M. L.** (2010) Sequencing technologies — the next generation, *Nature Reviews Genetics*, 11, 31–46.
- Mezo M., González-Warleta M., Carro C., Ubeira F. M.** (2004). An ultrasensitive capture elisa for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (mm3). *Journal of Parasitology*, 90, 845–852.
- Mohammad N., Karsaber M. T., Amani J., Ardjmand A., Zadeh M. R., Gholi M. K., Saffari M., Ghasemi A.** (2016) *In Silico* Design of a Chimeric Protein Containing Antigenic Fragments of *Helicobacter pylori*; A Bioinformatic Approach, *The open microbiology journal*. Bentham Science Publishers, 10, 97–112.
- Mokhtarian K., Meamar A. R., Khoshmirsafa M., Razmjou E., Masooei L., Khanmohammadi M., Akhlaghi L., Falak R.** (2018) Comparative assessment of recombinant and native immunogenic forms of *Fasciola hepatica* proteins for serodiagnosis of sheep fasciolosis, *Parasitology Research*, 117, 225–232.

Moon A. F., Mueller G. A., Zhong X., Pedersen L. C. (2010). A synergistic approach to protein crystallization: combination of a fixed-arm carrier with surface entropy reduction. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 19, 901–13.

Mulcahy G., Dalton J. P. (2001) Cathepsin L proteinases as vaccines against infection with *Fasciola hepatica* (liver fluke) in ruminants, *Research in Veterinary Science*, 70, 83–86.

National Center for Biotechnology Information. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (Accessed: 7 March 2018).

Noya O., De Noya B. A., Ballen D. E., Bermudez H., Bout D., Hoebeke J. (2001) Immunogenicity of synthetic peptides from the Sm31 antigen (cathepsin B) of the *Schistosoma mansoni* adult worms, *Parasite Immunology*. Wiley/Blackwell (10.1111), 23, 567–573.

Nuccitelli A., Cozzi R., Gourlay L. J., Donnarumma D., Necchi F., Norais N., Telford J. L., Rappuoli R., Bolognesi M., Maione D., Grandi G., Rinaudo C. D. (2011) Structure-based approach to rationally design a chimeric protein for an effective vaccine against Group B *Streptococcus infections*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 108, 10278–83.

O'Neill S. M., Parkinson M., Dowd A. J., Strauss W., Angles R., Dalton J. P. (1999) Short report: Immunodiagnosis of human fascioliasis using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L1 cysteine proteinase, *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60, 749–51.

Oberai A., Ihm Y., Kim S., Bowie J. U. (2006) A limited universe of membrane protein families and folds, *Protein science : a publication of the Protein Society*. Wiley-Blackwell, 15, 1723–34.

Nielsen J. (2013). Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered*, 4, 207–11.

Osman M. M., Shehab A. Y., el Masry S. A., Helmy M. H., Farag H. F. (1995). Evaluation of *Fasciola* excretory-secretory (E/S) product in diagnosis of acute human fasciolosis by IgM ELISA. *Tropical medicine and parasitology : official organ of Deutsche Tropenmedizinische Gesellschaft and of Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ)*, 46, 115–8.

Petersen T. N., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8, 785–786.

Ponnudurai R., Sayavedra L., Kleiner M., Heiden S. E., Thurmer A., Felbeck H., Schluter R., Sievert S. M., Daniel R., Schweder T., Markert S. (2017) Genome sequence of the sulfur-oxidizing *Bathymodiolus thermophilus* gill endosymbiont, *Standards in genomic sciences*. BioMed Central, 12, 50.

Purves D., Augustine G. J., Fitzpatrick D., Katz L. C., LaMantia A.-S., McNamara J. O., Williams S. M. (2001). *Neuroscience*. 2nd ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, c2001. ISBN 0-87893-742-0.

- Pybus M. J.** (2001). Liver flukes. In *Parasitic Diseases of Wild Mammals* (2.). Iowa: Iowa State University Press, 121–149.
- Racek J.** (2006). *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, c2006. ISBN 80-7262-324-9.
- Raclavský V.** (1998) *Úvod do základních metod molekulární genetiky*. Olomouc, 1998. ISBN 8070678925.
- Ranganathan S., Garg G.** (2009) Secretome: clues into pathogen infection and clinical applications, *Genome medicine*. BioMed Central, 1, 113.
- Rawlings N. D., Barrett A. J., Thomas P. D., Huang X., Bateman A., Finn R. D.** (2018) The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 46, D624–D632.
- Reddy Chichili V. P., Kumar V., Sivaraman J.** (2013). Linkers in the structural biology of protein-protein interactions. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 22, 153–67.
- Rhoads A., Au K. F.** (2015) *PacBio Sequencing and Its Applications*, *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. Elsevier, 13, 278–289.
- Riley B. E., Loughheed J. C., Callaway K., Velasquez M., Brecht E., Nguyen L., Shaler T., Walker D., Yang Y., Regnstrom K., Diep L., Zhang Z., Chiou S., Bova M., Artis D. R., Yao N., Baker J., Yednock T., Johnston J. A.** (2013). Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nature communications*, 4, 1982.
- Robinson M. W., Menon R., Donnelly S. M., Dalton J. P., Ranganathan S.** (2009). An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 8, 1891–907.
- Routzahn K. M., Waugh D. S.** (2002). Differential effects of supplementary affinity tags on the solubility of MBP fusion proteins. *Journal of structural and functional genomics*, 2, 83–92.
- Rokni M. B., Massoud J., O'Neill S. M., Parkinson M., Dalton J. P.** (2002) Diagnosis of human fasciolosis in the Gilan province of Northern Iran: application of cathepsin L-ELISA, *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 44, 175–9.
- Rothberg J., Myers J.** (2011) Semiconductor Sequencing for Life, *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*. The Association of Biomolecular Resource Facilities, 22, S41.
- Rubartelli A., Bajetto A., Allavena G., Wollman E., Sitia R.** (1992) Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway, *The Journal of biological chemistry*, 267, 24161–4.
- Saha S., Raghava G. P. S.** (2004) BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties, in: *Springer, Berlin, Heidelberg*, 197–204.

Sabourin M., Tuzon C. T., Fisher T. S., Zakian V. A. (2007). A flexible protein linker improves the function of epitope-tagged proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (Chichester, England), 24, 39–45.

Salimi-Bejestani M. R., McGarry J. W., Felstead S., Ortiz P., Akca A., Williams D. J. L. (2005). Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Research in veterinary science*, 78, 177–81.

Salimi-Bejestani M. R., Daniel R., Cripps P., Felstead S., Williams D. J. L. (2007). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Fasciola hepatica* in milk. *Veterinary parasitology*, 149, 290–3.

Shen G., Behera D., Bhalla M., Nadas A., Laal S. (2009) Peptide-based antibody detection for tuberculosis diagnosis, *Clinical and vaccine immunology : CVI*. American Society for Microbiology (ASM), 16, 49–54.

Schadt E. E., Turner S., Kasarskis A. (2010) A window into third-generation sequencing, *Human Molecular Genetics*. Oxford University Press, 19, R227–R240.

Singh H., Ansari H. R., Raghava G. P. S. (2013). Improved Method for Linear B-Cell Epitope Prediction Using Antigen's Primary Sequence. *PLoS ONE*, 8, e62216.

Soleimani M., Mahnam K., Mirmohammad-Sadeghi H., Sadeghi-Aliabadi H., Jahanian-Najafabadi A. (2016) Theoretical design of a new chimeric protein for the treatment of breast cancer, *Research in pharmaceutical sciences*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 11, 187–99.

Soria-Guerra R. E., Nieto-Gomez R. E., Gover-Alonso D. O., Rosales-Mendoza S. (2015) An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development, *Journal of Biomedical Informatics*. Academic Press, 53, 405–414.

Sriveny D., Raina O. K., Yadav S. C., Chandra D., Jayraw A. K., Singh M., Velusamy R. (2006) Cathepsin L cysteine proteinase in the diagnosis of bovine *Fasciola gigantica* infection, *Veterinary Parasitology*, 135, 25–31.

Stock Photos, Pictures and Royalty Free Videos | Shutterstock [online]. Copyright © 2003 [cit. 12.08.2018]. Available from: <https://www.shutterstock.com/image-vector/vector-reeds-water-lilies-scene-lotus-443529181>

Stoddart D., Heron A. J., Mikhailova E., Maglia G., Bayley H. (2009) Single-nucleotide discrimination in immobilized DNA oligonucleotides with a biological nanopore, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 106, 7702–7.

Sun G.-G., Wang Z.-Q., Liu Ch.-Y., Jiang P., Liu R.-D., Wen H., Qi X., Wang L., Cui J. (2015) Early serodiagnosis of trichinellosis by ELISA using excretory-secretory antigens of *Trichinella spiralis* adult worms, *Parasites & vectors*. BioMed Central, 8, 484.

- Tavares R., Ridruges M., Castelan L., Staggemeier R., Borges A., Vasconcelos J., Anschau M.** (2011) Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection, *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 17, 239–248.
- Théry C.** (2011) Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications, *F1000 biology reports*. Faculty of 1000 Ltd, 3,15.
- Toman M.** *Veterinární imunologie*. 2., dopl. a aktualiz. vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-2464-5.
- Tusnády G. E., Simon I.** (2001) The HMMTOP transmembrane topology prediction server, *Bioinformatics* (Oxford, England), 17, 849–50.
- UniProt Consortium T. U.** (2011) Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource, *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 39, D214-9.
- Veltman J. A., Fridlyand J., Pejavar S., Olshen A. B., Korkola J. E., DeVries S., Carroll P., Kuo W.-L., Pinkel D., Albertson D., Cordon-Cardo C., Jain A. N., Waldman F. M.** (2003) Array-based comparative genomic hybridization for genome-wide screening of DNA copy number in bladder tumors, *Cancer research*, 63, 2872–80.
- Vincent A. T., Derome N., Boyle B., Culley A. I., Charette S. J.** (2017) Next-generation sequencing (NGS) in the microbiological world: How to make the most of your money, *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier, 138, 60–71.
- Vita R., Overton J. A., Greenbaum J. A., Ponomarenko J., Clark J. D., Cantrell J. R., Wheeler D. K., Gabbard J. L., Hix D., Sette A., Peters B.** (2015). The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic acids research*, 43, D405-12.
- Wang J., Gao S., Zhang T., Kang L., Cao W., Xu N., Liu W., Wang J.** (2014) A recombinant chimeric protein containing B chains of ricin and abrin is an effective vaccine candidate, *Human vaccines & immunotherapeutics*. Taylor & Francis, 10, 938–44.
- Waldo G. S., Standish B. M., Berendzen J., Terwilliger T. C.** (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 17, 691–695.
- White R. R., Artavanis-Tsakonas K.** (2012) How helminths use excretory secretory fractions to modulate dendritic cells, *Virulence*. Taylor & Francis, 3, 668–77.
- Wayne A.** (2012). Cell Membrane Structures and Functions. *Basic Neurochemistry* [online]. Elsevier, 2012, 2012, s. 26-39 [cit. 2018-08-12]. DOI: 10.1016/B978-0-12-374947-5.00002-X. ISBN 9780123749475. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012374947500002X>.
- WHO | Fascioliasis diagnosis, treatment and control strategy.** WHO | World Health Organization [online]. Copyright © [cit. 11.08.2018]. Available from: http://www.who.int/foodborne_trematode_infections/fascioliasis/fascioliasis_diagnosis/en/
- Williams D. L., Bonilla M., Gladyshev V. N., Salinas G.** (2013) Thioredoxin glutathione reductase-dependent redox networks in platyhelminth parasites, *Antioxidants & redox signaling*. Mary Ann Liebert, Inc., 19, 735–45.

WormBase **ParaSite.** Available at:
<https://parasite.wormbase.org/species.html#Platyhelminthes> (Accessed: 24 June 2018).

Wu W., Chen J., Zeng Z., Zhang Z., Gan W., Yu X., Hu X. (2011) Molecular cloning, expression, and characterization of cyclophilin A from *Clonorchis sinensis*, Parasitology Research, 109, 345–351.

Xu X., Zhang D., Sun W., Zhang Q., Zhang J., Xue X., Shen L., Pan W. (2009) A *Schistosoma japonicum* chimeric protein with a novel adjuvant induced a polarized Th1 immune response and protection against liver egg burdens, BMC infectious diseases. BioMed Central, 9, 54.

Young N. D., Hall R. S., Jex A. R., Cantacessi C., Gasser R. B. (2010) Elucidating the transcriptome of *Fasciola hepatica* — A key to fundamental and biotechnological discoveries for a neglected parasite, Biotechnology Advances, 28, 222–231.

Young N. D., Jex A. R., Cantacessi C., Hall R. S., Campbell B. E., Spithill T. W., Tangkawattana S., Tangkawattana P., Laha T., Gasser R. B. (2011) A portrait of the transcriptome of the neglected trematode, *Fasciola gigantica*--biological and biotechnological implications, PLoS neglected tropical diseases. Public Library of Science, 5, e1004.

Yu K., Liu Ch., Kim B.-G., Lee D.-Y. (2015) Synthetic fusion protein design and applications, Biotechnology Advances, 33, 155–164.

Zang X., Maizels R. M. (2001) Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen, Trends in biochemical sciences, 26, 191–7.

Seznam příloh na CD

Příloha 1 – *In silico* sekretom *F. magna*: predikované sekretované proteiny pomocí webového programu PECAS; Transcript ID (název transkriptu), TargetP (predikce subcelulární lokalizace), SignalP (predikce signální sekvence), GPI (predikce GPI kotvy), TMHMM (predikce transmembránové domény)

Příloha 2 – *In silico* sekretom *F. magna*: Anotované a neanotované proteiny pomocí databáze NCBI

Příloha 3 – Anotace *in silico* sekretomu s pomocí databáze MEROPS

Příloha 4 – Transkripty identifikované pomocí MaxQuant a jejich anotace

Příloha 5 – Zastoupení jednotlivých transkriptů nacházejících se v *in silico* sekretomu a zároveň v ESP proteomu a jejich anotace

Příloha 6 – Padesát nejvíce exprimovaných proteinů v transkriptomu *F. magna*

Seznam zkratek

ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	hovězí sérový albumin
ESP	exkrečně-sekreční produkty
ELISA	enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
ER	endoplazmatické retikulum
FABP	fatty-acid-binding proteins
GIT	gastro-intestinální trakt
GMD	glutamátdehydrogenáza
GMT	gamma-glutamyltransferáza
LD	laktátdehydrogenáza
MBP	maltose-binding protein
NGS	Next-generation-sequencing
PBS	fosfátový pufr
PECAS	Prokaryotic and Eukaryotic Classical Analysis of Secretome
TMB	tetramethylbenzidin